



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Θέμα: Επιδράσεις υγρών περιτοναϊκής κάθαρσης σε ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα**

**Πιταράκη Ελεάννα**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ζαρογιάννης Σωτήριος, Επίκουρος Καθηγητής, Επιβλέπων
- Χατζόγλου Χρυσή, Καθηγήτρια
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής

**Λάρισα, Οκτώβριος, 2018**



**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCE**  
**FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN**  
**“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**MASTER THESIS**

**TITLE: Effects of peritoneal dialysis fluids on human mesothelial cells**

By  
Pitaraki Eleanna

Examination committee members:

- Zarogiannis Sotirios, Assistant Professor, Supervisor
- Hatzoglou Chryssi, Professor
- Germenis Anastasios, Professor

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Clinical Applications of Molecular Medicine

Larissa, October 2018

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ.....	11
2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΕΣΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	12
3. Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ ΩΣ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟΣ ΦΡΑΓΜΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗ ΚΑΘΑΡΣΗ.....	14
4. ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΜΕΣΟΘΗΛΙΑΚΗΣ ΜΟΝΟΣΤΙΒΑΔΑΣ.....	15
5. ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗ ΚΑΘΑΡΣΗ.....	17
6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ.....	18
7. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗΣ ΚΑΘΑΡΣΗΣ.....	20
8. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗΣ ΚΑΘΑΡΣΗΣ.....	21
8.1 Διαλύματα περιτοναϊκής κάθαρσης με ωσμωτικό μέσο τη γλυκόζη.....	21
8.2 Εναλλακτικά διαλύματα περιτοναϊκής κάθαρσης χωρίς δεξτρόζη.....	22
9. ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗΣ ΚΑΘΑΡΣΗΣ & ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ.....	23

### ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

10. ΣΚΟΠΟΣ.....	26
11. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
11.1 Κυτταρικές σειρές - Χειρισμοί κυτταροκαλλιιεργιών.....	27
11.2 Διαλύματα Περιτοναϊκής Κάθαρσης (Peritoneal Dialysis Fluids, PDFs).....	27
11.3 Δημιουργία μονοστιβάδας κυττάρων MeT-5A σε μεμβράνη υποστήριξης.....	29
11.4 Μέτρηση της διαμεσοθηλιακής ηλεκτρικής αντίστασης (transmesothelial electrical resistance, TER).....	29

11.5	Δοκιμή διαμεσοθηλιακής διαπερατότητας.....	30
11.6	Απομόνωση κολλαγόνου.....	30
11.7	Δοκιμή συστολής γέλης κολλαγόνου.....	31
11.8	Υπολογισμός ωσμωτικότητας.....	31
11.9	Ανάλυση δεδομένων.....	31
12.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
12.1	Διαμεσοθηλιακή ηλεκτρική αντίσταση της MeT-5A μονοστιβάδας.....	33
12.2	Επιδράσεις της προσθήκης διαλυμάτων περιτοναϊκής κάθαρσης στην TER.....	34
12.3	Παρακυτταρική μεταφορά της 10-kDa FITC-labeled δεξτράνης.....	38
12.4	Συσταλτότητα γέλης κολλαγόνου.....	39
12.5	Μετρήσεις ωσμωτικότητας.....	44
12.6	Περιεχόμενος όγκος υγρού ανά πολυμερισμένη γέλη κολλαγόνου.....	48
13.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	50
14.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55

## ***Πρόλογος - Ευχαριστίες***

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους ανθρώπους που γνώρισα κατά τη συμμετοχή μου στο Εργαστήριο Φυσιολογίας, ανθρώπους που συνεργάστηκα μαζί τους ευχάριστα και εποικοδομητικά, των οποίων η βοήθεια και η υποστήριξη υπήρξαν πολύτιμες για τη διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ειδικότερα, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Σωτήριο Ζαρογιάννη για την πολύτιμη καθοδήγηση και τις επιστημονικές του γνώσεις, μα πάνω από όλα για την εμπιστοσύνη και την εκτίμηση που μου έδειξε, χωρίς τα οποία δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Prof. Dr. med. Claus Peter Schmitt και την Dr. Maria Bartosova από το Εργαστήριο Παιδιατρικής Νεφρολογίας του Κέντρου Παιδιατρικής και Εφηβικής Ιατρικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Χαϊδελβέργης για την παροχή των κυττάρων MeT-5A αλλά και για τις χρήσιμες υποδείξεις και συμβουλές τους. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας-Νεφρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου της Θεσσαλονίκης για την παροχή των υγρών Περιτοναϊκής Κάθαρσης και τις για τις χρήσιμες υποδείξεις και συμβουλές του.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Rajesh Jagirdar, την μεταδιδακτορική ερευνήτρια κ. Ερασμία Ρούκα και τους προπτυχιακούς φοιτητές, Λευτέρη Παπάζογλου, Στέφανο Γιαννόπουλο, Λυδία Γιαννακού και Σωτήρη Σίνη για τις συμβουλές και υποδείξεις τους, καθώς και για τη στήριξη και την ενθάρρυνση που μου παρείχαν.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στην Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας κ. Χρυσή Χατζόγλου και στον Καθηγητή Ανοσολογίας κ. Αναστάσιο Γερμενή που αποτελούν μέλη της τριμελούς επιτροπής, για τη συμβολή τους στη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θέλω να πω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, που με υπομονή και κουράγιο στηρίζουν κάθε μου όνειρο και στόχο και καθιστούν δυνατή την εκπλήρωσή τους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Περιτοναϊκή Κάθαρση (ΠΚ) είναι μια θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου της ΠΚ η ανταλλαγή ύδατος και διαλυμένων ουσιών πραγματοποιείται με την εισαγωγή υγρών περιτοναϊκής κάθαρσης συγκεκριμένου όγκου για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα στην περιτοναϊκή κοιλότητα του ασθενούς. Ωστόσο, η παρατεταμένη έκθεση σε υγρά ΠΚ οδηγεί σε δομικές και λειτουργικές αλλοιώσεις της περιτοναϊκής μεμβράνης. Λύση στο πρόβλημα αυτό έχει επιχειρηθεί να δοθεί με την δημιουργία υγρών ΠΚ που θεωρούνται πιο βιοσυμβατά σε σχέση με τα συμβατικά υγρά ΠΚ που έχουν υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, χαμηλό pH, υψηλή συγκέντρωση παραπροϊόντων αποδόμησης της γλυκόζης που συνολικά συμμετέχουν σημαντικά στην έκπτωση της λειτουργικότητας της περιτοναϊκής μεμβράνης. Στην παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε τις μεταβολές που προκαλούν τρία βιοσυμβατά υγρά (BicaVera, Balance, Physioneal) και ένα συμβατικό (CAPD) στην διαμεσοθηλιακή αντίσταση μονοστιβάδας κυττάρων MeT-5A (0, 1, 5 ώρες), στην (%) παρακυτταρική μεταφορά φθορίζουσας δεξτράνης σε διάστημα 4h και στη συσταλτικότητα γέλης κολλαγόνου με ενσωματωμένα μεσοθηλιακά κύτταρα MeT-5A (1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup>, 3<sup>η</sup> ημέρα), ενώ ελέγχθηκαν και τυχόν διαφορές στην ωσμωτικότητα των υγρών ΠΚ που επώαστηκαν οι γέλες (1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup>, 3<sup>η</sup> ημέρα).

Από τα αποτελέσματα προκύπτει πως όλα τα βιοσυμβατά υγρά αύξησαν την διαμεσοθηλιακή αντίσταση της μονοστιβάδας στη 1h η οποία επανήλθε σε φυσιολογικά επίπεδα στις 5h, σε αντίθεση με του CAPD που μειώθηκε σημαντικά στις 5h. Παράλληλα η παρακυτταρική μεταφορά της FITC-dextran 10 kDa από τη 1h ως τις 5h ήταν σημαντικά μειωμένη στο CAPD σε σχέση με τα βιοσυμβατά υγρά. Στη δοκιμασία συστολής γέλης κολλαγόνου, η επιφάνεια γέλης του BicaVera ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από τα υπόλοιπα υγρά γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι το υγρό που επάγει λιγότερο μεσοθηλιακή-προς-μεσεγγυματική μετάβαση.

Συμπερασματικά οι επιδράσεις των βιοσυμβατών υγρών ΠΚ στην διαπερατότητα των μεσοθηλιακών μονοστιβάδων ήταν διαφορετικές από το συμβατικό υγρό, ενώ το υγρό ΠΚ που δεν περιείχε καθόλου γαλακτικό οξύ ως ρυθμιστικό διάλυμα επήγαγε σε μειωμένο βαθμό συσταλτό φαινότυπο στα μεσοθηλιακά κύτταρα.

**Λέξεις κλειδιά:** Διαμεσοθηλιακή ηλεκτρική αντίσταση, Μεσοθηλιακά κύτταρα, Μεσοθηλιακή-προς-μεσεγγυματική μετάβαση, Περιτοναϊκή Κάθαρση, Περιτόναιο, Υγρά περιτοναϊκής κάθαρσης,

## ABSTRACT

Peritoneal Dialysis (PD) is a renal replacement therapy in patients with End Stage Renal Disease. During PD the exchange of water and solutes takes place by introducing Peritoneal Dialysis Fluids (PDFs) in the abdominal cavities of the patient of specific volume and for specific duration. However, the prolonged exposure of the peritoneal membrane to PDFs results in structural and functional alterations of the peritoneum. In order to overcome this issue, new more bio-compatible PDFs have been developed as compared to the conventional ones that have high glucose concentration, low pH, and high concentration of glucose degradation products that collectively mediate the deterioration of the peritoneal membrane. In the current study we assessed the changes induced by three biocompatible PDFs (BicaVera, Balance, Physioneal) and one conventional PDF (CAPD) in the transmesothelial electrical resistance (TER) of MeT-5A monolayers (at 0, 1, 5 hours), in the (%) paracellular transport of FITC-dextran 10 kDa for a period of 4 hours and in the contraction of collagen gels with MeT-5A cells embedded to them (1st, 2nd, 3rd, day), while we also assessed differences in the osmolality of the fluids bathing the gels (1st, 2nd, 3rd, day).

Our results demonstrate that all biocompatible fluids increased the TER of the monolayers within the 1st hour of incubation which reached basal levels after 5h in contrast to CAPD that significantly decreased the TER after 5h. Concomitantly the paracellular transport of FITC-dextran 10KDa from the 1<sup>st</sup> to the 5<sup>th</sup> hour was significantly decreased in CAPD as compared to biocompatible fluids. In the collagen gel contraction assay, the area of BicaVera incubated gels was significantly increased as compared to the other PDFs which implies that it induces less potently the process of mesothelial-to-mesenchymal transition.

In conclusion the effects of biocompatible PDFs in the permeability of mesothelial monolayers were different than the conventional one while the PDF that did not contain lactate buffer induced in a lesser extent a contractile phenotype in mesothelial cells.

**Keywords:** Mesothelial cells, Mesothelial-to-Mesenchymal Transition, Peritoneal Dialysis, Peritoneal Dialysis Fluids, Peritoneum, Transmesothelial electrical resistance

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ΠΚ = Περιτοναϊκή Κάθαρση

TGF-β = Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (Transforming growth factor-β)

AQP = Υδατοπορίνη (Aquaporin)

TJs = Στενοσύνδεσμοι ή στεγανοί σύνδεσμοι (Tight junctions)

JAMs = Συνδετικά μόρια προσκόλλησης (Junctional adhesion molecules)

ECL = Εξωκυττάριος βρόγχος (Extracellular loop)

TER = Διαμεσοθηλιακή ηλεκτρική αντίσταση (Transmesothelial electrical resistance)

ESRD = Νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (End-stage renal disease)

ΣΦΠΚ = Συνεχής Φορητή Περιτοναϊκή Κάθαρση

CAPD = Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis

ΑΠΚ = Αυτοματοποιημένη Περιτοναϊκή Κάθαρση

APD = Automated Peritoneal Dialysis

GDPs = Προϊόντα αποικοδόμησης της γλυκόζης (Glucose Degradation Products)

AGEs = Τελικά προϊόντα μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης (Advanced Glucation End Products)

EPS = Περιτοναϊκή σκλήρυνση (Encapsulating peritoneal sclerosis)

TNF-α = Παράγοντας νέκρωσης όγκων α (Tumor necrosis factor-α)

VEGF = Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor)

MMT = Μεσοθηλιακή-προς-μεσεγχυματική μετάβαση (mesothelial-to-mesenchymal transition)

FBS = Εβρυϊκός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum)

PBS = Αλατούχο διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffered Saline)

PDFs = Διαλύματα Περιτοναϊκής Κάθαρσης (Peritoneal Dialysis Fluids)



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

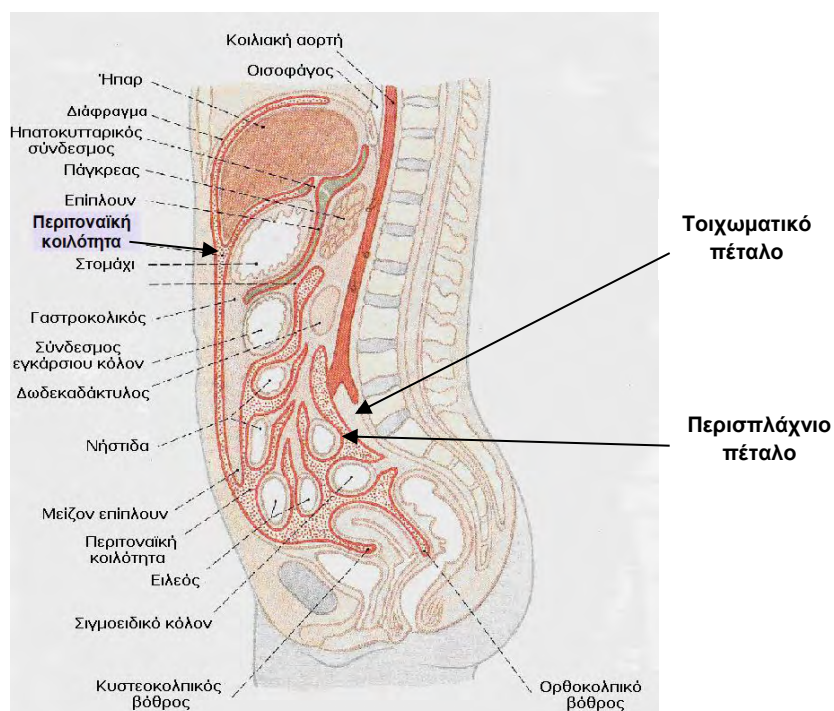
Η βάση της Περιτοναϊκής Κάθαρσης (ΠΚ) είναι η χρήση της περιτοναϊκής μεμβράνης ως ηθμό διήθησης για την απομάκρυνση διαλυτών ουσιών και ύδατος από ασθενείς με Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια τελικού σταδίου (1). Οι διαδικασίες που διέπουν την ΠΚ μπορούν να τροποποιηθούν ανεξάρτητα, με παραλλαγές του τύπου του διαλύματος περιτοναϊκής κάθαρσης που χρησιμοποιείται. Η απομάκρυνση των διαλυτών ουσιών επιτυγχάνεται με διάχυση (σύμφωνα με τη βαθμίδα συγκέντρωσης της κάθε ουσίας) και με συναπαγωγή, μέσω των οποίων μεταφέρονται διαμέσου της περιτοναϊκής μεμβράνης στην περιτοναϊκή κοιλότητα δημιουργώντας το υπερδιήθημα (2). Η σύσταση των ηλεκτρολυτών του διαλύματος περιτοναϊκής κάθαρσης μπορεί να τροποποιηθεί έτσι ώστε ορισμένες διαλυτές ουσίες είτε να μην ανταλλάσσονται, είτε να διαχέονται στο τριχοειδικό δίκτυο του ασθενούς. Η ισορροπία ύδατος μπορεί να μεταβληθεί αλλάζοντας την ωσμωτικότητα του χρησιμοποιούμενου διαλύματος περιτοναϊκής κάθαρσης, με αποτέλεσμα το ύδωρ να απορροφάται ή να απομακρύνεται ανάλογα. Ως συνέπεια όλων των παραπάνω, η χρήση του κατάλληλου διαλύματος περιτοναϊκής κάθαρσης είναι ένας βασικός παράγοντας για την επίτευξη της ομοιόστασης των ηλεκτρολυτών, της οξeo-βασικής ισορροπίας, της ισορροπίας ύδατος, και κυρίως της απομάκρυνσης των ουραιμικών τοξινών (3).

Τα πρώτα διαλύματα περιτοναϊκής κάθαρσης που χρησιμοποιήθηκαν συσχετίστηκαν με περιτοναϊκή ίνωση και με διαταραχές των ηλεκτρολυτών και της οξeo-βασικής ισορροπίας. Οι επακόλουθες έρευνες οδήγησαν στη διαπίστωση ότι η σύνθεση του διαλύματος έπρεπε να είναι παρόμοια με το μεσοκυττάριο υγρό και το διάλυμα υπέρτονο προς το πλάσμα, προκειμένου να επιτευχθεί η απομάκρυνση του ύδατος (υπερδιήθηση) (4). Έχουν αξιολογηθεί αρκετοί ωσμωτικοί παράγοντες, με τη γλυκόζη να είναι φθηνή, και σχετικά ασφαλής και αποτελεσματική. Έτσι, καθιερώθηκε να είναι ο τυπικός ωσμωτικός παράγοντας για τα διαλύματα περιτοναϊκής κάθαρσης, με μόνο μερικά πράγματα να έχουν αλλάξει έως σήμερα (5). Ωστόσο, η καλύτερη κατανόηση της ανατομίας και της φυσιολογίας του περιτοναίου έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη νεότερων διαλυμάτων περιτοναϊκής κάθαρσης με καλύτερη «βιοσυμβατότητα» *in vitro* αλλά και καλά κλινικά αποτελέσματα σε ασθενείς (6). Μια πιο ενδελεχής μελέτη αναφορικά με τις επιδράσεις των εμπορικά διαθέσιμων διαλυμάτων περιτοναϊκής κάθαρσης στα περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα, πιθανόν θα βοηθούσε στην προσπάθεια για μια καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στην απώλεια υπερδιήθησης και στην ίνωση του περιτοναίου ώστε να αναπτυχθούν στρατηγικές βελτίωσης της θεραπείας ασθενών που υποβάλλονται σε ΠΚ, με βελτιωμένη επιβίωση και λιγότερες επιπλοκές.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ

Το περιτόναιο (**Εικόνα 1**) αποτελεί τον μεγαλύτερο ορογόνο υμένα του ανθρωπίνου σώματος που καλύπτει την περιτοναϊκή κοιλότητα και τα εσωτερικά όργανα της κοιλιακής χώρας. Η επιφάνεια του στους ενήλικες είναι κατά προσέγγιση 1 με 2 m<sup>2</sup>, δηλαδή περίπου ανάλογη της επιφάνειας του σώματος (7). Ανατομικά χωρίζεται στο τοιχωματικό και στο περισπλάχνιο πέταλο. Το τοιχωματικό πέταλο αποτελεί μόλις το 20% της συνολικής επιφάνειας του περιτοναίου και επενδύει εσωτερικά τα τοιχώματα της κοιλίας και το διάφραγμα, ενώ το περισπλάχνιο πέταλο καταλαμβάνει περίπου το 80% της συνολικής επιφάνειας και περιβάλλει τα ενδοκοιλιακά όργανα, το στομάχι, το έντερο, τον σπλήνα και το ήπαρ καθώς και σχηματίζει τρεις μεγάλες πτυχές (μεσεντέριο, μεσόκολο, επίπλουν) (8,9). Το πάχος του περιτοναίου ποικίλει ανάλογα με την ανατομική θέση, με το τοιχωματικό πέταλο να έχει κατά μέσο όρο πάχος 2 mm και το περισπλάχνιο να κυμαίνεται από 30 έως 250 μm (10).



**Εικόνα 1:** Το περιτόναιο και τα όργανα που αυτό περιβάλλει. Διακρίνεται το τοιχωματικό και το περισπλάχνιο πέταλο και η περιτοναϊκή κοιλότητα που περιέχει το περιτοναϊκό υγρό. (Προσαρμογή από: Morton D, Foreman B, Albertine K. *The Big Picture: Gross Anatomy*, 1η Έκδοση, New York, McGraw-Hill, 2011:97-99).

Το διάστημα μεταξύ των δύο πετάλων ονομάζεται περιτοναϊκή κοιλότητα και περιέχει το περιτοναϊκό υγρό (11). Περιέχει μεταξύ άλλων φωσφολιποειδή του τύπου της φωσφατιδυλοχολίνης, τα μόρια της οποίας είναι προσανατολισμένα κατά τέτοιον τρόπο λόγω

του φορτίου τους, που να αποτρέπεται η διαφυγή του περιτοναϊκού υγρού προς τα διαφραγματικά λεμφαγγεία. Η σημασία του περιτοναϊκού υγρού έγκειται στην ολισθηρότητα που εξασφαλίζει στην περιτοναϊκή μεμβράνη, προφυλάσσοντας την από τη συνεχή τριβή που προκαλούν οι συσπάσεις του κοιλιακού τοιχώματος και οι αναπνευστικές κινήσεις του διαφράγματος (12). Ο όγκος του υγρού (περίπου 100 cm<sup>3</sup> υπό φυσιολογικές συνθήκες) είναι αποτέλεσμα διεργασιών διήθησης και απορρόφησης μεταξύ του τριχοειδικού δικτύου και της περιτοναϊκής κοιλότητας. Η σύνθεση του είναι αυστηρώς ρυθμιζόμενη τόσο από ενδογενείς όσο και εξωγενείς παράγοντες όπως η διαφορά μεταξύ υδροστατικής και κολλοειδωσμοτικής πίεσης του περιτοναϊκού υγρού και του τριχοειδικού αίματος, η αλλαγή του pH ή της θερμοκρασίας, η εκάστοτε σύνθεση του περιτοναϊκού διαλύματος κατά την εφαρμογή της περιτοναϊκής κάθαρσης (σε περίπτωση ασθενών) κ.ά. (13–15).

Αναφορικά με την ιστολογία του περιτοναίου, η ελεύθερη επιφάνεια της περιτοναϊκής μεμβράνης επικαλύπτεται από μονοστιβάδα μεσοθηλιακών κυττάρων που επικάθονται σε λεπτή βασική μεμβράνη. Κάτω από τη βασική μεμβράνη υπάρχει στρώμα συνδετικού ιστού (διάμεσος ιστός) που περιέχει ένα χαλαρό τρισδιάστατο δίκτυο, διαμορφωμένο από ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης, ινοβλάστες, μακροφάγα, μαστοκύτταρα και λιποκύτταρα (16,17). Μέσα σε αυτό το υπόστρωμα πορεύονται αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία καθώς και νεύρα τα οποία διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη διατήρηση της λειτουργικότητας του περιτοναίου. Επομένως, εκτός από μέσο στήριξης, ο συνδετικός ιστός χρησιμεύει και ως διηθητικός φραγμός επιτρέποντας τη διακίνηση νερού, ηλεκτρολυτών, οξυγόνου και άλλων θρεπτικών ουσιών ανάμεσα στο ενδοαγγειακό διαμέρισμα και την περιτοναϊκή κοιλότητα (18).

## **2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΕΣΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Χαρακτηριστικό των μεσοθηλιακών κυττάρων του περιτοναίου είναι η εξωτερική μορφολογία τους. Η κορυφαία επιφάνεια (κυτταρική επιφάνεια προς την περιτοναϊκή κοιλότητα) τους φέρει πολυάριθμους κροσσούς ή μικρολάχνες, και ορισμένες φορές βλεφαρίδες. Η παρουσία των δομών αυτών οδηγεί σε αύξηση της ολικής επιφάνειας της περιτοναϊκής μεμβράνης κατά 20 φορές (19). Η κατανομή τους δεν είναι ομοιογενής καθώς παρατηρούνται συχνότερα στο περισπλάχνιο πέταλο παρά στο τοιχωματικό (20). Οι μικρολάχνες έχουν κυρίως προστατευτικό ρόλο και παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία ακόμη και στον ελάχιστο τραυματισμό, ενώ το αρνητικό φορτίο τους καθορίζει εν μέρει τη διαπερατότητα του περιτοναίου για τις διάφορες ουσίες. Οι λειτουργικές ιδιότητες των βλεφαρίδων αντικατοπτρίζονται στη ρύθμιση της έκκρισης επιφανειοδραστικών ουσιών. Και οι δύο δομές ανταποκρίνονται σε

μικροπεριβαλλοντικές αλλαγές. Μάλιστα, μείωση του αριθμού τους όπως συμβαίνει συχνά σε ασθενείς που υποβάλλονται σε περιτοναϊκή κάθαρση (ΠΚ) προκαλεί μείωση της λειτουργικότητας του περιτοναίου και αποτελεί ένδειξη απόπτωσης των κυττάρων (21–23).

Το ολισθηρό στρώμα γλυκοκάλυκα το οποίο δημιουργείται χάρη στην έκκριση γλυκοζαμινογλυκανών, πρωτεογλυκανών και φωσφολιπιδίων βοήθησε στο να αναγνωριστεί ο ρόλος των μεσοθηλιακών κυττάρων της περιτοναϊκής κοιλότητας στην προστασία από την τριβή, που δημιουργείται λόγω της κίνησης των ενδοκοιλιακών οργάνων. Τα μεσοθηλιακά κύτταρα αποτελούν επίσης βασικούς ρυθμιστές της μεταφορικής λειτουργίας της περιτοναϊκής μεμβράνης. Πρόκειται για μια κατηγορία εξειδικευμένων επιθηλιακών κυττάρων με ενεργό συμβολή στη διαμεμβρανική μεταφορά ουσιών και στην έκκριση του περιτοναϊκού υγρού, όπως προέκυψε από μια πληθώρα ερευνών, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (24–28). Εξίσου σημαντικός είναι και ο ρόλος τους στη διατήρηση της ομοιόστασης της μεμβράνης και στην ιστική επιδιόρθωση. Αυτή η λειτουργία συντελείται από την απελευθέρωση μιας πληθώρας φλεγμονωδών και αυξητικών παραγόντων, αλλά και συστατικών θεμέλιας ουσίας που διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση (11,21). Λόγω της μετανάστευσης γειτονικών κυττάρων, της μετάπλασης του συνδετικού ιστού κάτω από το μεσοθηλιακό στρώμα, η περιοχή του ελλείμματος σε περίπτωση τραυματισμού αποκαθίσταται ταυτόχρονα και ολοκληρώνεται σε διάστημα 5-7 ημερών (29,30). Αναλυτικότερα, η έκκριση χημειοκινών από τα μεσοθηλιακά κύτταρα προάγει τη διαμεσοθηλιακή μετανάστευση των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων στο σημείο της βλάβης και την εισροή των λευκοκυττάρων από το αγγειακό δίκτυο στην περιτοναϊκή κοιλότητα (31), ενώ η έκκριση κυτοκινών διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Τελικά τα μεσοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν και προσκολλώνται στο σημείο της βλάβης πετυχαίνοντας την ιστική επιδιόρθωση και «επαναμεσοθηλοποίηση» της περιοχής (32). Οι προηγούμενες ιδιότητες των μεσοθηλιακών κυττάρων είναι μείζονος σημασίας για κακώσεις της μεμβράνης που δημιουργούνται αρκετά συχνά κατά την ΠΚ.

Πολύ σημαντική αποδεικνύεται επίσης η ινωδολυτική δράση των κυττάρων (29). Η αποφυγή της δημιουργίας συμφύσεων μεταξύ της περιτοναϊκής μεμβράνης προκύπτει από την ικανότητα τους να διασπών και να απομακρύνουν συγκεντρώσεις ινωδογόνου/ινώδους που δημιουργούνται στην περιτοναϊκή κοιλότητα μετά από μηχανικό τραυματισμό ή φλεγμονή (21).

Επιπρόσθετα, έπειτα από τραυματισμό, τα μεσοθήλιο αναγεννάται χάρη στον πολλαπλασιασμό κυττάρων που βρίσκονται στην άκρη του τραύματος καθώς και στην προσκόλληση ελεύθερων μεσοθηλιακών κυττάρων που περιέχονται στο περιτοναϊκό υγρό. Κατά τη διαδικασία αναγέννησης λαμβάνει χώρα ενίοτε και η μεσοθηλιακή-προς-μεσεγγυματική

μετάβαση (MMT) κατά την οποία μεσοθηλιακά κύτταρα μεταπίπτουν σε μυοϊνοβλάστες με στόχο επανόρθωση της δομικής καταστροφής του ιστού. Φυσιολογικά η διαδικασία παύει όταν υποχωρήσει η φλεγμονή. Ωστόσο, το MMT μπορεί παθολογικά να συνεχίσει σε χρόνια φλεγμονή, οδηγώντας τελικά σε ανεξέλεγκτη παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας και κατ' επέκταση στην ίνωση του περιτοναίου. Σε αυτό το πλαίσιο συγκαταλέγεται και η ίνωση που προκύπτει από την μακροχρόνια έκθεση σε υγρά περιτοναϊκής κάθαρσης, τα οποία σύμφωνα με ενδείξεις αυξάνουν τα επίπεδα αυξητικών παραγόντων (π.χ. TGF-β) που έχουν επιτελικό ρόλο στη διαδικασία του MMT (32–34).

### **3. Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ ΩΣ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟΣ ΦΡΑΓΜΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗ ΚΑΘΑΡΣΗ**

Κατά την εφαρμογή της ΠΚ το περιτόναιο με την μεγάλη επιφάνεια, την πλούσια αγγείωση και την υψηλή αιματική ροή του, διαδραματίζει ρόλο διηθητικού φραγμού (9). Αυτός ο περιτοναϊκός φραγμός συγκροτείται από το εξωτερικό στρώμα της περιτοναϊκής μεμβράνης, τον υποκείμενο συνδετικό ιστό και τα ενδοθηλιακά κύτταρα του μικροαγγειακού δικτύου (35). Προκειμένου λοιπόν να μεταφερθούν οι διαλυμένες ουσίες από το πλάσμα των τριχοειδών του περιτοναίου στο διάλυμα κάθαρσης που εισάγεται στην περιτοναϊκή κοιλότητα, χρειάζεται να διαπεράσουν α) το ενδοθήλιο των τριχοειδών, β) το διάμεσο ιστό και γ) τη μονοστιβάδα των μεσοθηλιακών κυττάρων.

Από αυτές τις δομές, ο πιο σημαντικός φραγμός κατά τη διαδικασία μεταφοράς θεωρείται το τοίχωμα των τριχοειδών διότι περιορίζει την ανταλλαγή ουσιών στο 0,01% της συνολικής επιφάνειας του (18,36). Η παρατήρηση πως η μεταφορά των διαλυμένων ουσιών εξαρτάται από το μέγεθος τους οδήγησε στην ανάπτυξη του μοντέλου των «τριών πόρων» του αγγειακού τοιχώματος (37). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο η διακίνηση των ουσιών γίνεται μέσω τριών πόρων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικής ποσοτικής κατανομής επί της περιτοναϊκής μεμβράνης (38,39). Οι "μεγάλοι πόροι" (large pores, 100-200 Å) που αντιστοιχούν περίπου στο 3% του συνόλου των πόρων, διαμεσολαβούν στη μεταφορά μακρομορίων (π.χ. πρωτεϊνών). Οι "μικροί πόροι" (small pores, 40-50 Å) αποτελούν τη συντριπτική πλειονότητα της συνολικής επιφάνειας πόρων που διατίθεται για διακίνηση μικρών διαλυτών μορίων (π.χ. ουρία, γλυκόζη, κρεατινίνη). Η μοριακή ταυτότητα των δυο αυτών ειδών πόρων δεν έχει ταυτοποιηθεί. Τέλος, οι "πολύ μικροί πόροι" (ultrasmall pores, <3 Å) που βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των περιτοναϊκών τριχοειδών έχουν ταυτοποιηθεί ως ο διάυλος ύδατος, Aquaporin-1. Είναι αποκλειστικά υπεύθυνοι για τη διακυτταρική μεταφορά του νερού που προκαλείται από την

ωσμωτική διαφορά έπειτα από την εισαγωγή του διαλύματος κάθαρσης στην περιτοναϊκή κοιλότητα (13,40–42).

Ο διάμεσος ιστός συνιστάται από δέσμες ινών κολλαγόνου και βλενοπολυσακχαρίτες που του προσδίδουν μορφή γέλης που σποραδικά περιέχει ινοβλάστες και το καθιστούν δεύτερο επίπεδο φραγμού. Ωστόσο, ινίδια πρωτεογλυκάνης διαπλέκονται μεταξύ τους δημιουργώντας ένα λεπτό δικτυωτό σχηματισμό που γεμίζει τους χώρους ανάμεσα στις ίνες κολλαγόνου. Σε αυτές τις μικρές σχισμοειδείς περιοχές μεταξύ των μικροινιδίων ενυπάρχει το διάμεσο υγρό που όμως δεν είναι στατικό, αλλά επιτρέπει τη μετακίνηση ηλεκτρολυτών και άλλων ουσιών (43,44).

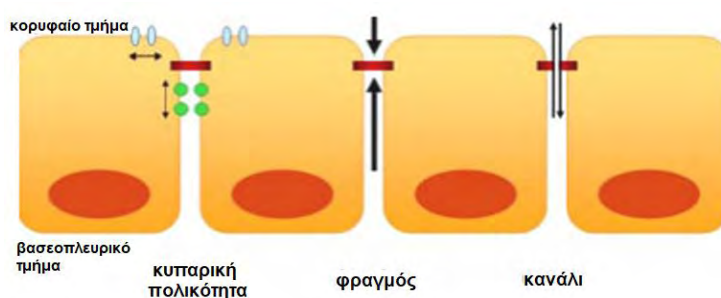
Η μονοστιβάδα των μεσοθηλιακών κυττάρων αποτελεί τον τελευταίο ανατομικά φραγμό κατά τη διακίνηση διαλυμένων ουσιών και ύδατος, όχι όμως και τον τελευταίο από άποψη ερευνητικού ενδιαφέροντος. Ο ρόλος του μεσοθηλίου θεωρείται εξέχουσας σημασίας για τη δομική και λειτουργική διατήρηση του περιτοναίου ασθενών που υποβάλλονται σε ΠΚ, ιδίως σε περιπτώσεις μακροχρόνιας εφαρμογής της, γι' αυτό και αξίζει να μελετηθεί σε μεγαλύτερο βάθος.

#### **4. ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΜΕΣΟΘΗΛΙΑΚΗΣ ΜΟΝΟΣΤΙΒΑΔΑΣ**

Τα μεσοθηλιακά κύτταρα που εδράζονται στη βασική μεμβράνη ελέγχουν την κυκλοφορία ηλεκτρολυτών και ύδατος από και προς την περιτοναϊκή κοιλότητα, δρώντας ως ένας φυσικός και χημικός φραγμός. Παρεμποδίζουν την ανεξέλεγκτη διάχυση και συναπαγωγή ουσιών ενώ την ίδια στιγμή προσφέρουν θέσεις επιλεκτικής διέλευσης μορίων και ιόντων (45).

Η διαμεσοθηλιακή μεταφορά πραγματοποιείται μέσω δύο μονοπατιών: του διακυτταρικού και του παρακυτταρικού (46,47). Το διακυτταρικό μονοπάτι αναφέρεται στη μεταφορά διαμέσου του κυτταροπλάσματος. Πρόκειται για παθητική ή ενεργητική μεταφορά κατά την οποία ουσίες διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη ανάλογα με τις ηλεκτροχημικές τους βαθμιδώσεις και τις απαιτούμενες ανάγκες του κυττάρου. Αντιθέτως, το παρακυτταρικό μονοπάτι αφορά στην παθητική διάχυση που λαμβάνει χώρα σύμφωνα με την ηλεκτροχημική βαθμίδωση μεταξύ των διαχωριζόμενων περιοχών της κορυφαίας και πλευρικής επιφάνειας των κυττάρων της μονοστιβάδας. Ουσίες που ακολουθούν αυτή την οδό διέρχονται μέσω του πλάγιου μεσοκυττάριου χώρου, όπως συμβαίνει σε πολλά σημεία του σώματος (π.χ. εντερικό επιθήλιο, επιθήλιο των νεφρικών σωληναρίων και των εξωκρινών αδένων, επιθήλιο της ουροδόχου κύστης κ.λπ.). Βάσει της συνεισφοράς του εκάστοτε μονοπατιού στη μετακίνηση διαλυμένων ουσιών, τα επιθήλια καλούνται διαπερατά (leaky) ή αποφρακτικά (tight) (46–48).

Βασική δομή του μεσοκυττάριου χώρου με πρωτεύοντα ρόλο στη ρύθμιση της παρακυτταρικής μεταφοράς είναι οι στενοσύνδεσμοι ή στεγανοί σύνδεσμοι (Tight Junctions, TJs) που συνδέουν μεταξύ τους τα παρακείμενα μεσοθηλιακά κύτταρα, περιβάλλοντας τα κυκλοτερώς στην κορυφαία επιφάνεια της πλασματικής τους μεμβράνης (49,50). Τα TJs επιτελούν δύο βασικές λειτουργίες (**Εικόνα 2**). Καταρχήν, σχηματίζουν έναν ημιδιαπερατό παρακυτταρικό φραγμό διάχυσης που εξασφαλίζει την εκλεκτική παρακυτταρική διάχυση εξαρτώμενη από το φορτίο και το μέγεθος των ουσιών η οποία είναι άμεσα συναρτώμενη από τη τα πρωτεϊνικά συστατικά των TJs [λειτουργία φράγματος ή καναλιού (barrier or channel function)] (51,52). Δεύτερον, παρεμποδίζουν την ανάμιξη δομικών μεμβρανικών συστατικών διότι αποκλείουν τη μεταφορά πρωτεϊνών μεταξύ του κορυφαίου (apical) και του βασεοπλευρικού (basolateral) τμήματος της κυτταρικής μεμβράνης, συμβάλλοντας στη διατήρηση της κυτταρικής πολικότητας (fence function) (45,53). Αναφορικά με τη σύσταση τους, τα TJs είναι μια υπερμοριακή οργάνωση συγκροτούμενη από πρωτεΐνες προσδεσμένες στη μεμβράνη (membrane-spanning proteins) [π.χ. κλαουδίνες (claudins), οκλουδίνη (occludin), tricellulin] και πρωτεΐνες προσαρμογείς και ικριώματα (adapter and scaffolding proteins) [π.χ. συνδετικά μόρια προσκόλλησης (junctional adhesion molecules, JAMs), ZO-1, ZO-2, ZO-3, ζινγκουλίνη (cingulin), MUPP-1] (54,55). Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες συμμετέχουν σε διαδικασίες «αγκύρωσης» των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στα ινίδια ακτίνης του κυτταροσκελετού, σε αντίθεση με τις κλαουδίνες που ρυθμίζουν κατά κύριο λόγο τη μετακίνηση διαλυμένων ουσιών μέσω του παρακυτταρικού μονοπατιού με ένα μηχανισμό ελεγχόμενης διόδου βασισμένο στο μέγεθος και το φορτίο των ιόντων (56).



**Εικόνα 2:** Κύρια χαρακτηριστικά των στενοσυνδέσμων ή στεγανών συνδέσμων (TJs): Τα TJs συμμετέχουν στο διαχωρισμό του κορυφαίου και του βασεοπλευρικού τμήματος, εμποδίζοντας έτσι τις μεμβρανικές πρωτεΐνες να αλλάξουν τοπολογία και διατηρώντας την κυτταρική πολικότητα ("fence"). Τα TJs ελέγχουν επίσης την επιλεκτική ως προς το φορτίο και το μέγεθος, επιθηλιακή διακίνηση διαλυμένων ουσιών παρέχοντας φράγματα ή διαύλους διαπερατότητας ("barrier" και



"channel"). (Προσαρμογή από: Will C et al Claudin tight junction proteins: novel aspects in paracellular transport. *Perit Dial Int.* 2008;28(6):577-84).

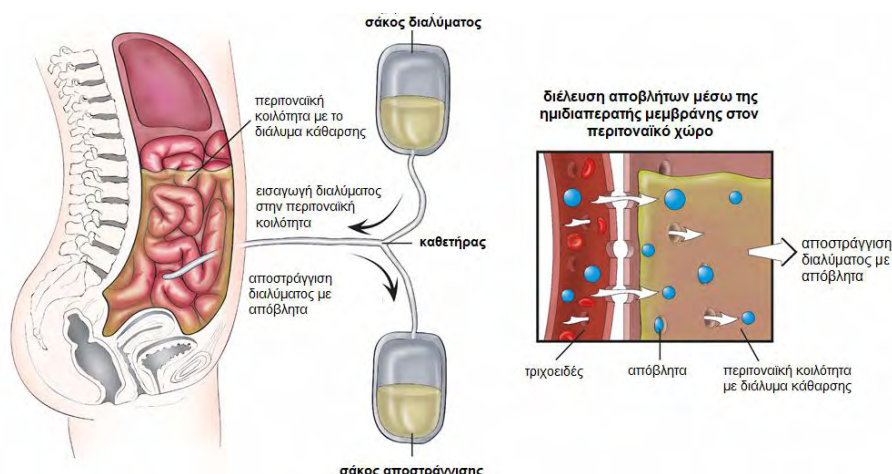
Ως εκ τούτου, θεωρώντας τις κλαουδίνες μείζονες τελεστές εκλεκτικής μεταφοράς ουσιών μέσω του περιτοναίου κατά την ΠΚ, οι επιστημονικές μελέτες σχετικά με τη δυνητική τροποποίηση της έκφρασης ή/και εντόπισης τους υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων ολοένα και αυξάνονται. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί και αναγνωριστεί 27 μέλη της οικογένειας των κλαουδινών στα κύτταρα των θηλαστικών. Το μόριο των κλαουδινών χαρακτηρίζεται από την παρουσία τεσσάρων διαμεμβρανικών περιοχών, δύο εξωκυτταρικών βρόγχων (ECL-1, ECL-2) και ενός μικρού ενδοκυτταρικού βρόγχου (57). Το καρβοξυτελικό τμήμα με προσανατολισμό προς το κυτταρόπλασμα αλληλοεπιδρά μέσω της περιοχής PDZ με άλλες πρωτεΐνες των TJs (58–60). Συνοψίζοντας τις λειτουργίες τους, οι κλαουδίνες έχουν ουσιώδη ρόλο στην παρακυτταρική διαπερατότητα, με ορισμένα μέλη της οικογένειας να συμμετέχουν στο σχηματισμό φραγμού, ενώ άλλα στο σχηματισμό πόρων μεσολαβώντας στη μετακίνηση ιόντων και μορίων (51). Συχνά συνεκφράζονται και στο σύνολο τους καθορίζουν τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες του μεσοθηλίου και την ολική παρακυτταρική διαπερατότητα, η οποία μπορεί να προσδιοριστεί με τη μέτρηση της διαμεσοθηλιακής ηλεκτρικής αντίστασης (transmesothelial electrical resistance, TER) (55,61).

## 5. ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗ ΚΑΘΑΡΣΗ

Η νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (end-stage renal disease, ESRD) είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας, που οφείλεται σε έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Ο επιπολασμός της νόσου συνεχίζει να αυξάνεται ραγδαία και αυτό την καθιστά αντικείμενο έντονου κλινικού και ερευνητικού ενδιαφέροντος. Παρότι η μεταμόσχευση νεφρού είναι η προτεινόμενη θεραπεία, η δυσαναλογία μεταξύ διαθέσιμων μοσχευμάτων και υποψήφιων ληπτών φέρει την πλειοψηφία των ασθενών με ESRD αντιμέτωπη με χρόνιες θεραπείες κάθαρσης, όπως είναι η αιμοκάθαρση και η περιτοναϊκή κάθαρση. Μολονότι δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για την υπεροχή της μίας έναντι της άλλης, η χρήση της ΠΚ εφαρμόζεται μόλις στο 10% των ασθενών διεθνώς (1,62).

Η ΠΚ είναι μια μέθοδος υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας που εισήχθη στην κλινική πράξη πριν από 40 περίπου χρόνια ως μια εναλλακτική θεραπεία αντί της αιμοκάθαρσης, που παρέχει στους ασθενείς μεγαλύτερη ανεξαρτησία και καλύτερη ποιότητα ζωής δεδομένου πως γίνεται κατ' οίκον. Σε αυτή την επιλογή όπως ήδη αναφέρθηκε το περιτόναιο λειτουργεί ως μια ημιδιαπερατή μεμβράνη κάθαρσης μέσω της οποίας επιτελούνται η υπερδιήθηση και η διάχυση (9,35). Τα διαλύματα της περιτοναϊκής κάθαρσης εισάγονται μέσω ενός καθετήρα στην

περιτοναϊκή κοιλότητα και διατηρούνται εντός της κοιλότητας για 4-6 ώρες συνήθως. Κατά τη διάρκεια ενός κύκλου ΠΚ ανταλλάσσονται ύδωρ και ουραιμικές τοξίνες μεταξύ του υγρού της ΠΚ και του πλάσματος των τριχοειδών της περιτοναϊκής μεμβράνης (**Εικόνα 3**) (63). Παρά τη μικρή επιφάνεια του, το τοιχωματικό πέταλο είναι αυτό που συμμετέχει πιο ενεργά στην εφαρμογή της μεθόδου, αφού μόλις το 1/3 του περισπλάχνιου πετάλου έρχεται σε επαφή με το διάλυμα. Η ΠΚ βασίζεται ουσιαστικά στην υψηλή διαπερατότητα και το πλούσιο αγγειακό και λεμφικό δίκτυο του περιτοναίου. Η μεταφορά λαμβάνει χώρα μεταξύ του ενδοαγγειακού χώρου και της περιτοναϊκής κοιλότητας σύμφωνα με την οσμωτική κλίση και αποσκοπεί στη ρύθμιση της υδατο-ηλεκτρολυτικής και οξεο-βασικής ισορροπίας του οργανισμού (5,36,64). Κατά τη διαδρομή μίας ουσίας από τον αυλό του τριχοειδούς αγγείου μέχρι και το διάλυμα κάθαρσης χρειάζεται να διαπεράσει τις εξής θέσεις αντίστασης: α) τον ενδοαγγειακό γλυκοκάλυκα των ενδοθηλιακών κυττάρων, β) τα ενδοθηλιακά κύτταρα, γ) την τριχοειδική βασική μεμβράνη, δ) το διάμεσο ιστό, ε) τα μεσοθηλιακά κύτταρα και στ) το μεσοθηλιακό γλυκοκάλυκα (2).



**Εικόνα 3:** Έκχυση διαλυμάτων περιτοναϊκής κάθαρσης στην περιτοναϊκή κοιλότητα με καθετήρα και μετακίνηση ύδατος και διαλυμένων ουσιών προς αποβολή. (Ανατύπωση από: <http://www.tynesidekpa.org.uk/peritoneal-dialysis/>)

## 6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ

Όπως έγινε σαφές από τα προηγούμενα, το περιτόναιο έχει ρόλο βιολογικού φραγμού συμμετέχοντας ενεργά στη διακίνηση ύδατος, ηλεκτρολυτών και άλλων ουσιών. Για να γίνει κατανοητή η λειτουργία του ως μεμβράνη διήθησης χρειάζεται να αναφερθούν οι κύριοι μηχανισμοί μεταφοράς κατά τη διάρκεια της ΠΚ. Η μεταφορά των διαλυμένων ουσιών και του ύδατος διέπεται από τους κανόνες της διάχυσης και της συναπαγωγής (convection) - υπερδιήθησης (ultrafiltration), ενώ το αρνητικό φορτίο της περιτοναϊκής μεμβράνης συνιστά

παράγοντα εκλεκτικής διαπερατότητας (65). Οι δύο αυτές διεργασίες επιτελούνται συγχρόνως (44).

Η διάχυση πραγματοποιείται σε συνθήκες όπου υπάρχει διαφορά συγκέντρωσης μιας ουσίας εκατέρωθεν της μεμβράνης. Στην περίπτωση αυτή η ουσία μεταφέρεται παθητικά προς την κατεύθυνση της ηλεκτροχημικής διαφοράς των δύο διαμερισμάτων (πλάσμα και υγρό κάθαρσης) χωρίς όμως τη μετακίνηση του διαλυτικού μέσου. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το μηχανισμό της διάχυσης είναι: α) το χημικό πρηνές, β) το μοριακό βάρος της υπό μεταφορά ουσίας, γ) η δραστική επιφάνεια του περιτοναίου που καθορίζεται από τη θέση σώματος του ασθενούς που υποβάλλεται σε ΠΚ, δ) η ενδογενής αντίσταση της μεμβράνης, ε) η αιματική ροή και ο αριθμός των τριχοειδών που επηρεάζονται από την ωσμωτικότητα και το pH του διαλύματος κάθαρσης, στ) η θερμοκρασία του διαλύματος, ζ) ο ολικός όγκος του διαλύματος ανά 24ωρο και τέλος η) η διάρκεια του κύκλου αλλαγής (18,35). Κατά την έναρξη ενός κύκλου αλλαγής η κλίση συγκέντρωσης μιας ουσίας είναι μεγάλη (μηδενική συγκέντρωση ουσίας στο διάλυμα κάθαρσης) και σταδιακά μειώνεται. Κατ' επέκταση μειώνεται και η αποτελεσματικότητα της κάθαρσης ως προς την ουσία. Προκειμένου να παραμείνει υψηλή η κλίση συγκέντρωσης ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη κάθαρση, απαιτούνται είτε συχνότερες αλλαγές είτε μεγαλύτεροι όγκοι διαλυμάτων (65). Η χορήγηση μεγαλύτερων όγκων διαλυμάτων μπορεί να βελτιστοποιήσει επίσης τη δραστική επιφάνεια του περιτοναίου. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι οι ενδοκοιλιακές δομές πιέζεται πιο έντονα με αποτέλεσμα να αυξάνεται η επιφάνεια που έρχεται σε επαφή με το διάλυμα κάθαρσης. Η απόσταση των τριχοειδών από το μεσοθήλιο της μεμβράνης κατά μήκος του διάμεσου ιστού σε συνδυασμό με τις διαφορές στον αριθμό των πόρων που φέρουν ανά μονάδα εμβαδού επιφάνειας καθορίζουν την ενδογενή αντίσταση της περιτοναϊκής μεμβράνης. Ουσίες μικρού μοριακού βάρους διαχέονται ταχύτερα από ουσίες μεγαλύτερου μοριακού βάρους (18).

Ο δεύτερος μηχανισμός μεταφοράς, η συναπαγωγή, αφορά τη μεταφορά του διαλύματος κάθαρσης μέσω της ημιδιαπερατής περιτοναϊκής μεμβράνης με συναπαγωγή μέρους των διαλυτών ουσιών. Οφείλεται στη διαφορά της ωσμωτικής πίεσης μεταξύ του υπέρτονου διαλύματος και του σχετικά με αυτό υπότονου αίματος των τριχοειδών αγγείων της μεμβράνης (66). Ως αποτέλεσμα αυτής της διαφοράς πιέσεων, ύδωρ και διαλυτές ουσίες μετακινούνται από τα τριχοειδή προς την περιτοναϊκή κοιλότητα. Η αποτελεσματικότητα του μηχανισμού κατά την ΠΚ καθορίζεται από τα χάσματα μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη μεταφορά ύδατος μέσω των "πολύ μικρών πόρων" και την παρακυτταρική διέλευση μέσω των TJs (38).

Ο ρυθμός υπερδιήθησης κατά τη διάρκεια της ΠΚ εξαρτάται από την υδροστατική και κολλοειδωσμωτική πίεση του ενδοτριχοειδικού και ενδιάμεσου χώρου. Φυσιολογικά η

υδροστατική πίεση στα τριχοειδή είναι υψηλότερη από την ενδοπεριτοναϊκή. Κατά συνέπεια η υδροστατική πίεση ευνοεί την υπερδιήθηση και προκαλεί έξοδο νερού από τα τριχοειδή μέσω διαύλων AQP1 (25). Η συμπύκνωση αίματος που επέρχεται οδηγεί με τη σειρά της σε αύξηση της κολλοειδωσμοτικής πίεσης η οποία συνοδεύεται από μείωση της υδροστατικής. Αυτό σημαίνει πως η έξοδος ύδατος σταδιακά επιβραδύνεται, ενώ αυξάνεται η μεταφορά γλυκόζης - που αποτελεί τον κύριο ωσμωτικό παράγοντα διαλυμάτων κάθαρσης διαφόρων πυκνοτήτων - από το διάλυμα προς τα τριχοειδή (41). Δεδομένου των παραπάνω, το πρυνές γλυκόζης στην αρχή ενός κύκλου περιτοναϊκής αλλαγής είναι μεγάλο αλλά σταδιακά μειώνεται αφενός λόγω της αραίωσης της συγκέντρωσης της γλυκόζης από το υπερδιήθημα και αφετέρου λόγω της διάχυσης της προς το αίμα. Επομένως, η αντίσταση της περιτοναϊκής μεμβράνης στη μεταφορά γλυκόζης καθορίζει και την αποτελεσματικότητα της ως ωσμωτικό παράγοντα (67). Μεμβράνες που έχουν χαμηλότερη διαπερατότητα στη γλυκόζη απομακρύνουν περισσότερο ύδωρ διότι διατηρούν τον ωσμωτικό παράγοντα στην περιτοναϊκή κοιλότητα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της ΠΚ παρατηρείται και το φαινόμενο του «κοσκινίσματος νατρίου» (sodium sieving) κατά το οποίο ένα ποσοστό μιας διαλυμένης ουσίας κατακρατείται ή φιλτράρεται κατά τη διέλευση μέσω της μεμβράνης κάθαρσης μαζί με το ύδωρ. Απομακρύνεται συνεπώς μεγαλύτερη ποσότητα ύδατος από ότι νατρίου και η αποτελεσματικότητα της υπερδιήθησης ως μέθοδος συναπαγωγής μειώνεται. Ο συντελεστής κατακράτησης διαφέρει από ασθενή σε ασθενή και εξαρτάται από το μοριακό βάρος και το φορτίο της ουσίας (39). Κατά την εφαρμογή της ΠΚ το φαινόμενο του «κοσκινίσματος νατρίου» οφείλεται κατά κύριο λόγο στους διαύλους AQP1, από τους οποίους μπορεί να διέλθει αποκλειστικά ύδωρ και είναι υπεύθυνοι για το 50% της ολικής υπερδιήθησης (68,69).

## **7. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗΣ ΚΑΘΑΡΣΗΣ**

Οι τεχνικές ΠΚ που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι δύο. Η πρώτη είναι η ‘συνεχής φορητή περιτοναϊκή κάθαρση’ (ΣΦΠΚ) (Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis, CAPD) και περιλαμβάνει τον περιτοναϊκό καθετήρα, το ενδιάμεσο συνδετήριο τμήμα και το σύστημα του διπλού σάκου του περιτοναϊκού διαλύματος. Το διάλυμα κάθαρσης παραμένει στην περιτοναϊκή κοιλότητα και αντικαθίσταται 4 φορές την ημέρα -στο πρόγευμα, το μεσημεριανό γεύμα, αργά το απόγευμα και το βράδυ- από τον ίδιο τον ασθενή. Ο συνήθης όγκος διαλύματος που εγχέεται σε κάθε αλλαγή (fill volume) είναι περίπου 2 λίτρα, ανάλογα βέβαια και με ενός ανάγκες του

ασθενούς. Τις περισσότερες φορές εφαρμόζεται μία αλλαγή τη νύχτα, η οποία διαρκεί 8-10 ώρες, ενώ οι ημερήσιες αλλαγές διαρκούν 4-6 ώρες (13).

Η δεύτερη τεχνική είναι η ‘αυτοματοποιημένη περιτοναϊκή κάθαρση’ (ΑΠΚ) (Automated Peritoneal Dialysis, APD) και αναφέρεται ενός αλλαγές που επιτελούνται με τη βοήθεια μιας ειδικής συσκευής, του αυτοματοποιημένου κυκλοποιητή (cycler). Αυτό το μηχάνημα προσφέρει το πλεονέκτημα ενός αυτόματης πλήρωσης και αποστράγγισης του διαλύματος κάθαρσης ενώ ο ασθενής κοιμάται. Η παραμονή του διαλύματος ΠΚ διαρκεί για 8 με 10 ώρες (dwell time) κατά τη διάρκεια ενός νύχτας και σε σπάνιες περιπτώσεις επιτελείται μια επιπλέον αλλαγή κατά τη διάρκεια ενός ημέρας (5,70).

Η ΑΠΚ έχει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με την ΣΦΠΚ κυρίως όσον αφορά τη διατήρηση ενός υγιούς περιτοναίου και την αποτελεσματικότητα ενός ΠΚ. Πιο συγκεκριμένα, με την ΑΠΚ μειώνονται οι περιπτώσεις περιτονίτιδας και ο αριθμός των επιπλοκών που οφείλονται στην αύξηση ενός ενδοπεριτοναϊκής πίεσης (π.χ. λιγότερες κήλες, απουσία άλγους κατά την είσοδο του διαλύματος, λιγότερες περιπτώσεις διαφυγής υγρού). Επιπλέον, ο μηχανισμός υπερδιήθησης έχει πιο μακροπρόθεσμη επάρκεια και συνοδεύεται από υψηλότερες καθάρσεις μοριακών ουσιών. Τέλος, η ΑΠΚ είναι ευκολότερη από πλευράς διατιθέμενου χρόνου για τη διενέργεια της ΠΚ και επομένως η ευελιξία της συγκεκριμένης μεθόδου προσφέρει καλύτερη ποιότητα ζωής στους δραστήριους ασθενείς που μπορούν να αξιοποιήσουν πιο ενεργά την ημέρα τους (64,71,72).

## **8. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗΣ ΚΑΘΑΡΣΗΣ**

Τα διαλύματα περιτοναϊκής κάθαρσης περιέχονται σε αποστειρωμένους πλαστικούς σάκους ενός, δύο ή τριών διαμερισμάτων και θερμαίνονται σε θερμοκρασία σώματος πριν την έκχυση. Η σύσταση ενός διαλύματος ΠΚ είναι τέτοια ώστε να επάγεται μετακίνηση των τοξικών ουραιμικών ουσιών όπως αυτή προκύπτει από τη διαφορά πιέσεων και το χημικό πραινές. Η περιεκτικότητα σε νάτριο, κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, γλυκόζη μπορεί να ποικίλει για να καλύπτουν όλο το εύρος ενός ωσμωτικότητας. Ως ρυθμιστικό παράγοντας στο διάλυμα χρησιμοποιούνται τα γαλακτικά, τα διττανθρακικά ή ο συνδυασμός τους, ενώ η γλυκόζη είναι ο συνηθέστερος ωσμωτικός παράγοντας.

### **8.1 Διαλύματα περιτοναϊκής κάθαρσης με ωσμωτικό μέσο τη γλυκόζη**

Η πλειοψηφία των εμπορικά διαθέσιμων διαλυμάτων ΠΚ περιέχουν ως ωσμωτικό μέσο τη γλυκόζη, σε μονοϋδρική μορφή (δεξτρόζη, M.B.=198 Da) και άνυδρη (M.B.=180 Da)

διαφορετικών συγκεντρώσεων (1,36%, 2,27%, 3,86%). Η χρήση της καθιερώθηκε λόγω του χαμηλού κόστους και της εύκολης παρασκευής, ενώ συγχρόνως θεωρείται καλή πηγή θερμίδων και σχετικά ασφαλής, με έλλειψη τοξικών επιδράσεων στη συστηματική κυκλοφορία. Από την άλλη, δημιουργήθηκε η ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών ωσμωτικών παραγόντων εξαιτίας των μειονεκτημάτων που φάνηκε να έχει. Όπως προέκυψε από παρατηρήσεις η παρατεταμένη χρήση γλυκόζης προδιαθέτει για υπεργλυκαιμία, υπερινσουλιναίμία, υπερλιπιδαιμία και παχυσαρκία. Η ταχεία απορρόφηση μεγάλης ποσότητας αυτής μέσω της περιτοναϊκής μεμβράνης οδηγεί σε απώλεια της υπερδιήθησης (73,74). Συνάμα η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων προϊόντων αποικοδόμησης της γλυκόζης (Glucose Degradation Products, GDPs) και τελικών προϊόντων μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation End Products, AGEs) αποβαίνει βλαπτική για την ακεραιότητα της περιτοναϊκής μεμβράνης κατά την ΠΚ. Η παραγωγή των δύο προϊόντων οφείλεται στο μεταβολισμό της γλυκόζης και στην αποστείρωση των διαλυμάτων με θερμότητα αντίστοιχα (75–77). Τα προβλήματα που σχετίζονται με τα διαλύματα ΠΚ βασίζονται στη γλυκόζη γλυκόζη όπως αυτά προκύπτουν από την καθαυτή ουσία αλλά και από τα παράγωγα προϊόντα της, σε συνδυασμό με το όξινο pH και την υπερ-ωσμωτικότητα, οδήγησαν στην εγκαθίδρυση του ορισμού περί «βιοσυμβατότητας» των διαλυμάτων κάθαρσης, δηλαδή ικανότητας να αφήνουν τα ανατομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του περιτοναίου ανεπηρέαστα στο χρόνο (78,79).

## **8.2 Εναλλακτικά διαλύματα περιτοναϊκής κάθαρσης χωρίς γλυκόζη**

Σε μια προσπάθεια βελτιστοποίησης των διαλυμάτων κάθαρσης, οι ερευνητικές μελέτες των τελευταίων ετών στράφηκαν στη χρήση άλλων ωσμωτικών παραγόντων π.χ. αμινοξέων ή ικοδεξτρίνης.

Τα διαλύματα αμινοξέων είναι ευεργετικά για το προφίλ θρέψης των υποσιτιζόμενων ασθενών. Για το λόγο αυτό η χορήγηση τους ενδείκνυται σε ασθενείς με διαταραχές μεταβολισμού, συμβάλλοντας έτσι στη βελτίωση της κατάστασης τους. Παρενέργειες ωστόσο διαπιστώνονται και σε αυτά τα διαλύματα διότι προκαλούν μεταβολική οξέωση και αύξηση της συγκέντρωσης ουρίας στο πλάσμα του αίματος λόγω της προσφοράς αμινοξέων ως μεταβολικού υποστρώματος (80–82).

Τα περιτοναϊκά διαλύματα ικοδεξτρίνης χρησιμοποιούνται με επιτυχία εδώ και δύο δεκαετίες. Προτιμώνται κατά τη μακρά αλλαγή σε ασθενείς με ανεπάρκεια υπερδιήθησης ή σε ασθενείς με χαρακτηριστικά υψηλού μεταφορέα (13,83). Η ικοδεξτρίνη αποτελεί ένα μεγάλου μοριακού βάρους (μέσο M.B.=16 kDa) μείγμα υδατοδιαλυτών πολυμερών της γλυκόζης με παρόμοια βιοχημική δομή με το γλυκογόνο. Παράγεται από την υδρόλυση του αμύλου του καλαμποκιού.

Ο μηχανισμός δράσης της βασίζεται στην υπερδιήθηση μέσω κολλοειδωσμοτικής πίεσης. Η απορρόφηση της από την περιτοναϊκή κοιλότητα μέσω των λεμφαγγείων είναι περιορισμένη (84) με αποτέλεσμα η ωσμωτική κλίση να παραμένει σχετικά σταθερή, διευκολύνοντας την υπερδιήθηση καθ' όλη τη διάρκεια μακράς αλλαγής (85). Γενικότερα, τα διαλύματα ικοδεξτρίνης έχουν παρόμοια ωσμωτικότητα με το πλάσμα και είναι χαμηλής περιεκτικότητας σε GDPs, γεγονός που τα καθιστά πιο «βιοσυμβατά» συγκριτικά με τα «συμβατικά» διαλύματα γλυκόζης (6,86,87).

Συνολικά, τα εναλλακτικά διαλύματα κάθαρσης στοχεύουν στη χρήση διαφορετικών ωσμωτικών ουσιών, στη διατήρηση ενός φυσιολογικού pH και στη μείωση των ποσοτήτων GDPs και AGEs στις οποίες εκτίθεται το περιτόναιο.

## **9. ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗΣ ΚΑΘΑΡΣΗΣ & ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟΥ**

Η εφαρμογή της ΠΚ ως θεραπευτική προσέγγιση είναι περιορισμένη (μέγιστη διάρκεια εφαρμογής 5-6 έτη) με ένα υψηλό ποσοστό, της τάξεως του 50%, ασθενών με ESRD που υποβάλλονται στη θεραπεία να εμφανίζουν αποτυχία υπερδιήθησης και να προβαίνουν αναγκαστικά σε διακοπή της και μεταφορά σε θεραπεία αιμοκάθαρσης (64,88). Οι επιπλοκές της μεθόδου ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για την κατάταξη της ως θεραπεία δεύτερης γραμμής. Μεγάλη ερευνητική πρόοδος έχει υπάρξει στον τομέα της ΠΚ τα τελευταία χρόνια, ενώ οι μελέτες στοχεύουν στην κατανόηση της παθογένειας των επιπλοκών. Η διατήρηση της περιτοναϊκής ακεραιότητας είναι πιθανώς η μεγαλύτερη πρόκληση σε ασθενείς με ESRD υπό θεραπεία ΠΚ. Η αυξημένη περιτοναϊκή διαπερατότητα με αποτυχία υπερδιήθησης, η σκληρυντική περιτονίτιδα και η περιτοναϊκή ίνωση είναι από τις κύριες αιτίες αποτυχίας της θεραπείας σε βάθος χρόνου. Παρατεταμένη έκθεση σε διαλύματα κάθαρσης έχει συσχετιστεί με μορφολογικές και λειτουργικές αλλοιώσεις της περιτοναϊκής μεμβράνης και ενδεχόμενη ανάπτυξη περιτοναϊκής σκλήρυνσης που μπορεί να αποβεί θανατηφόρος (89–91).

Η περιτονίτιδα οφείλεται στη μεταφορά μικροβίων από το εξωτερικό περιβάλλον στην κοιλιακή χώρα στο σημείο εισαγωγής του περιτοναϊκού καθετήρα στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Στην έγκαιρη διάγνωση της περιτονίτιδας έχει προταθεί η διαγνωστική αξία κυτταροκινών, όπως του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF-α) (92). Η περιτοναϊκή ίνωση και οι μεταβολές της λειτουργίας του περιτοναίου που τη συνοδεύουν αποτελούν σημαντικές επιπλοκές μετά από λοίμωξη. Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός

παράγοντας (VEGF) (93) και ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (TGF-β) έχουν ενοχοποιηθεί στην παθογένεια της ίνωσης (94,95).

Αναφέρθηκε ήδη ότι τα διαλύματα κάθαρσης περιέχουν μη-βιοσυμβατά βλαβερά συστατικά (GDPs, AGEs) που μπορεί να προάγουν δομικές αλλαγές της περιτοναϊκής μεμβράνης. Η συνεχής έκθεση του περιτοναίου σε αυτά οδηγεί σε απώλεια της μεσοθηλιακής στοιβάδας (76), πάχυνση του περιτοναίου, ίνωση και νεοαγγειογένεση, που αποτελούν συνιστώσες μιας φυσιολογικής κυτταρικής διεργασίας γνωστής ως μεσοθηλιακή-προς-μεσεγχυματική μετάβαση (mesothelial-to-mesenchymal transition, MMT) (6,33,96). Το χαμηλό pH, η υψηλή συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος, η υψηλή ωσμωτικότητα των διαλυμάτων και οι επαναλαμβανόμενες ενδοπεριτοναϊκές λοιμώξεις συμβάλλουν σταδιακά στις προαγωγή των παραπάνω μεταβολών (97). Θεμελιώδη ρόλο στη διαδικασία της προαναφερθείσας περιτοναϊκής παθολογίας έχουν τα μεσοθηλιακά κύτταρα. Κατά τη διαδικασία του MMT χάνουν την πολικότητα τους, αποκολλώνται και μεταναστεύουν στις βαθύτερες στοιβάδες του ιστού, μεταβαίνοντας από ένα μεσοθηλιακό φαινότυπο σε μυοϊνοβλάστες οι οποίοι με τη σειρά τους παράγουν συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας και προάγουν την νεοαγγειογένεση (98). Ο TGF-β διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη διαδικασία αυτή, ενώ όπως προκύπτει από πειραματικές μελέτες η αύξηση της παραγωγής του διεγείρεται από την φλεγμονή που προκαλείται από τα «συμβατικά» διαλύματα, τα AGEs ή τις λοιμώξεις (94). Οι επαγόμενες από AGEs και λοίμωξη ιστολογικές αλλαγές έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται σημαντικά με την υψηλότερη διαπερατότητα της περιτοναϊκής μεμβράνης και δευτερευόντως με την νεοαγγειογένεση και την αγγειοδιαστολή (99,100).



## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 10. ΣΚΟΠΟΣ

Η ΠΚ αποτελεί μία αξιόπιστη μέθοδο υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια (ΧΝΑ) τελικού σταδίου. Η εφαρμογή της εντούτοις φαίνεται να περιορίζεται στα πρώτα 5 με 6 χρόνια, καθώς οι ασθενείς με ΧΝΑ εντάσσονται έπειτα σε χρόνιο πρόγραμμα αιμοκάθαρσης λόγω ανεπάρκειας της αρχικής μεθόδου (101). Στις επιπλοκές ύστερα από μακροχρόνια εφαρμογή της μεθόδου της ΠΚ συγκαταλέγονται πιθανά επεισόδια περιτονίτιδας, απώλεια της υπολειπόμενης νεφρικής λειτουργίας και απώλεια της λειτουργικότητας του περιτοναίου (90,102). Η βασική διαταραχή της λειτουργικότητας της περιτοναϊκής μεμβράνης ερμηνεύεται μέσω της απώλειας υπερδιήθησης που προκαλεί ελαττωμένη κάθαρση ουσιών (4,103). Οι αιτίες των διαταραχών αυτών δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητές. Υπάρχουν ωστόσο στοιχεία που τις συσχετίζουν με δομικές αλλαγές των μεσοθηλιακών περιτοναϊκών κυττάρων σαν αποτέλεσμα της εφαρμογής της μεθόδου (33,91).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση των επιδράσεων τεσσάρων εμπορικά διαθέσιμων υγρών περιτοναϊκής κάθαρσης (CAPD, BicaVera, Balance, Physioneal) όσον αφορά την διαπερατότητα μεσοθηλιακών μονοστιβάδων κυττάρων MeT-5A, μετρώντας την διαμεσοθηλιακή αντίσταση και την παρακυτταρική διέλευση φθορίζουσας δεξτράνης 10 kDa καθώς και την επαγωγή συσταλού φαινοτύπου μέσω της δοκιμασίας συστολής γέλης κολλαγόνου με ενσωματωμένα μεσοθηλιακά MeT-5A κύτταρα.

## 11. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### 11.1 Κυτταρικές σειρές - Χειρισμοί κυτταροκαλλιέργειών

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά MeT-5A (ATCC catalog #CRL 9444). Πρόκειται για μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά αθανатоποιημένων μεσοθηλιακών κυττάρων υπεζωκότα που προέρχεται από φυσιολογικό μεσοθήλιο. Τα MeT-5A κύτταρα αναπαράχθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI (R5886, Sigma) εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum, FBS) (#F0804-500, Sigma), 2 mM L-Glutamine (#G7513, Sigma) και αντιβιοτικά 1% Pen-Strep (100 U/mL Penicillin και 100 µg/mL Streptomycin) (#P4333, Sigma), 0.5% w/v Plasmocin (ANT-MPP, InvivoGen). Οι καλλιέργειες των MeT-5A επώαστηκαν στους 37°C σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα (95% αέρα - 5% CO<sub>2</sub>), μέσα σε πλαστικές φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας (#BS611, Sterillin). Κάθε δύο μέρες κατά τη διάρκεια της κυτταροκαλλιέργειας γινόταν απομάκρυνση (με αναρρόφηση) του θρεπτικού υλικού, πλύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline) και ανανέωση του θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα συγχρονίστηκαν με στέρηση ορού (0.5% FBS-RPMI) για 24 ώρες πριν τα πειράματα δοκιμασίας συστολής γέλης κολλαγόνου (collagen gel contraction assay). Για την έναρξη των πειραματικών διεργασιών, τα κύτταρα σε κάθε φλάσκα κυτταροκαλλιέργειας αφού είχαν φτάσει σε πληρότητα περίπου 80-90% πλύθηκαν με PBS. Ακολούθησε προσθήκη 2 mL θρυψίνη (#T4049, Sigma), με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων τόσο μεταξύ τους όσο και με το υπόστρωμα, και μεταφέρθηκαν στον επωαστήρα για 5 λεπτά στους 37°C. Προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού 10% FBS-RPMI, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν. Προκλήθηκε ιζηματογένεση των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 2,5 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, προκειμένου να αποβληθεί η θρυψίνη που είχε προστεθεί. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2 mL θρεπτικού υλικού και έγινε ομοιόμορφη διασπορά των κυττάρων. Ο υπολογισμός των κυττάρων έγινε σε πλάκα Neubauer, αφού προστέθηκαν 10 µl από το εναιώρημα των κυττάρων σε 90 µl Trypan blue (#T6146-25G, Sigma) (αραίωση 1:10) και 10 µl αυτού του διαλύματος μεταφέρθηκαν στην πλάκα. Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων έγινε στο μικροσκόπιο (Nikon Eclipse TS100) σε μεγέθυνση 100X.

### 11.2 Υγρά Περιτοναϊκής Κάθαρσης (Peritoneal Dialysis Fluids, PDFs)

Πληροφορίες σχετικά με τη σύσταση των υγρών κάθαρσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη δίνονται στον **Πίνακα 1**. Τα περιεχόμενα των σάκων πολλαπλών

διαμερισμάτων, σε όσα υγρά ήταν απαραίτητο (BicaVera, Balance, Physioneal), αναμείχθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες για τον όγκο αραίωσης κάθε διαμερίσματος.

**Πίνακας 1:** Χαρακτηριστικά υγρών περιτοναϊκής κάθαρσης που επιλέχθηκαν στην παρούσα μελέτη:

Διάλυμα (κατασκευαστής)	pH	Ωσμωτικότητα (mOsm/L)	Διαμε- ρίσματα	Ρυθμιστικό διάλυμα	(%w/v) Ωσμωτικός παράγοντας	[Ca <sup>+2</sup> ]	[Mg <sup>+2</sup> ]
CAPD (Baxter)	5.0/6.5	404.4	Ένα	Γαλακτικά (37.5mM C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	2.5% Γλυκόζη	1.75 mmol/L	0.37 mmol/L
BicaVera (Fresenius)	7.4	401	Δύο	Διττανθρακικά (34 mM HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	2.3% Γλυκόζη	1.75 mmol/L	0.5 mmol/L
Balance (Fresenius)	7.0	401	Δύο	Γαλακτικά (35mM C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	2.3% Γλυκόζη	1.75 mmol/L	0.5 mmol/L
Physioneal (Baxter)	7.4	396	Δύο	Γαλακτικά (10mMC <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) / Διττανθρακικά (25 mM HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	2.27% Γλυκόζη	1.75 mmol/L	0.25 mmol/L

### 11.3 Δημιουργία μονοστιβάδας κυττάρων MeT-5A σε μεμβράνη υποστήριξης

Για την κατασκευή ενός *in vitro* μοντέλου μιας μεσοθηλιακής μονοστιβάδας προκειμένου να μελετηθεί η διαπερατότητά της, ένα εναιώρημα κυττάρων MeT-5A ( $5 \times 10^4$  cells/well) τοποθετήθηκε και καλλιεργήθηκε σε ένα φίλτρο πολυεστέρα (Transwell; 12 inserts in a 24-well plate, 0.4  $\mu$ m pore size, 6.5 mm diameter) (Corning incorporated Costar, USA, #CLS3470-48EA, Sigma-Aldrich). Στο άνω διαμέρισμα του θαλάμου Transwell που βρίσκεται η κορυφαία επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων εισήχθησαν 200  $\mu$ l και στο κάτω διαμέρισμα 1 mL θρεπτικού υλικού (10% FBS-RPMI), αντίστοιχα. Η πλάκα που φέρει τους θαλάμους Transwell διατηρήθηκε στους 37°C σε επωστήρα με 5% CO<sub>2</sub> και κάθε 2 μέρες γινόταν αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού έως ότου τα μεσοθηλιακά κύτταρα να σχηματίσουν μια πλήρη μονοστιβάδα.

### 11.4 Μέτρηση της διαμεσοθηλιακής ηλεκτρικής αντίστασης (transmesothelial electrical resistance, TER)

Η διαμεσοθηλιακή ηλεκτρική αντίσταση (TER) της μονοστιβάδας των κυττάρων MeT-5A μετριόταν καθημερινά με το EVOM Volt/Ohm meter που φέρει ειδικά SXT-2 electrodes (World Precision Instruments, Sarasota, FL34240-9258, USA) τα οποία εισάγονταν μέσα στα δύο διαμερίσματα του φίλτρου πολυεστέρα. Στην αρχή κάθε πειράματος μετρήσεων TER, σε ένα φίλτρο πολυεστέρα γινόταν προσθήκη μόνο θρεπτικού υλικού (10% FBS-RPMI) χωρίς την παρουσία κυττάρων και οριζόταν ως «blank». Η τιμή TER του blank φίλτρου αφαιρούνταν από τις τιμές των υπόλοιπων φίλτρων που περιείχαν MeT-5A κύτταρα. Τέλος, οι τιμές των TER που προέκυπταν πολλαπλασιάζονταν με την δραστική επιφάνεια (0,33 cm<sup>2</sup>) του φίλτρου που αποτελούσε υπόστρωμα για τη δημιουργία κυτταρικής μονοστιβάδας και η ηλεκτρική αντίσταση της MeT-5A μονοστιβάδας εκφραζόταν σε  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . Υπήρχε μια χρονικά εξαρτώμενη αύξηση της ηλεκτρικής αντίστασης η οποία αυξανόταν σταδιακά και σε διάστημα περίπου 5 ημερών παρουσίαζε πλατό.

Κατά την 5<sup>η</sup> ημέρα, όπου επιτυγχανόταν η πλήρωση της μονοστιβάδας και η TER παρέμενε σταθερή, πραγματοποιούνταν αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού όλων των Transwell διαμερισμάτων από ανάλογη ποσότητα (200  $\mu$ l και 1 mL στο ανώτερο και κατώτερο διαμέρισμα, αντίστοιχα) PDFs 2,3% w/v γλυκόζη (CAPD/BicaVera/Balance/Physioneal). Η TER μετρήθηκε τις χρονικές στιγμές 0 (στιγμή εισαγωγής διαλυμάτων), 1 ώρα και 5 ώρες.

### 11.5 Μέτρηση διαμεσοθηλιακής διαπερατότητας μονοστιβάδας κυττάρων MeT-5A

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η TER των MeT-5A μονοστιβάδων παρακολουθούταν καθημερινά μέχρις. Αφού η τιμή της αντίστασης σταθεροποιήθηκε, η διαπερατότητα της μονοστιβάδας αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία διάχυσης μοριακών δεικτών. Η fluorescein isothiocyanate-labeled δεξτράνη (FITC-labeled δεξτράνη) με μοριακό βάρος 10 kDa (#FD10S-100MG, Sigma-Aldrich) χρησιμοποιήθηκε ως φθορίζων μοριακός δείκτης παρακυτταρικής μεταφοράς. Μία ώρα αργότερα από την προσθήκη των PDFs, 200 µl κάθε διαλύματος κάθαρσης αναμειγμένα με FITC-labeled δεξτράνη προστέθηκαν στο ανώτερο διαμέρισμα ενώ 1 mL διαλύματος που περιείχε unlabeled δεξτράνη από *Leuconostoc mesenteroides* με μοριακό βάρος 9-11 kDa (#D9260-10G, Sigma-Aldrich) προστέθηκε στο κατώτερο διαμέρισμα των βοθρίων Transwell σε τελική συγκέντρωση 1 mg/mL. Τα Transwell διατηρήθηκαν στους 37°C σε επωαστήρα 5% CO<sub>2</sub>, για μια περίοδο επώασης 4 ωρών. Στις 5 ώρες, συλλέχθηκαν δείγματα 100 µl και από τα δύο διαμερίσματα των βοθρίων Transwell και μεταφέρθηκαν σε ένα 96-well plate (#655 180, Griener Bio-one). Ο φθορισμός καταγράφηκε από μια συσκευή μέτρησης μικροπλακών φθορισμού (spectrophotometer FLx800, BioTek) με φίλτρα απορρόφησης 490 nm και εκπομπής 520 nm.

### 11.6 Απομόνωση κολλαγόνου από ουρές αρουραίων

Το κολλαγόνο που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική δοκιμασία συστολής γέλης κολλαγόνου απομονώθηκε από τους τένοντες ουρών αρουραίων. Οι ουρές συλλέχθηκαν από λευκούς Norwegian Sprague-Dawley αρουραίους που είχαν υποβληθεί σε ευθανασία και προοριζόνταν για απόρριψη, και ήταν μια ευγενική χορηγία του Επ. Καθ. Κωνσταντίνου Δήμα (Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας). Οι ουρές των αρουραίων κόπηκαν κάθετα στον προσθιο-οπίσθιο άξονα σε τακτά διαστήματα χωρίς διείσδυση στον πυρήνα της ουράς. Τμήματα 1 cm άθικτου δέρματος αποκολλήθηκαν από την ουρά και στη συνέχεια απομακρύνθηκαν οι τένοντες με τη βοήθεια λαβίδας. Αφού ζυγίστηκαν, οι τένοντες βυθίστηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 95% και ξηράθηκαν στον αέρα θαλάμου κάθετης νηματικής ροής. Μετά την ξήρανση τους αφέθηκαν σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης, υπό διαδικασία έκπλυσης με οξικό οξύ 0,2 M για 16 ώρες στους 4°C. Το διάλυμα υποβλήθηκε δύο φορές σε διαύγαση με φυγοκέντρωση στις 2500 rpm για 20 λεπτά, προκειμένου να καθιζάνει η μη διαλελυμένη πρωτεΐνη. Τέλος, το προκύπτον διάλυμα κολλαγόνου αποθηκεύτηκε σε αποστειρωμένη γυάλινη φιάλη στους 4°C.

### 11.7 Δοκιμασία συστολής γέλης κολλαγόνου με ενσωματωμένα κύτταρα MeT-5A

Συγχρονισμένα MeT-5A κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμασία συστολής γέλης κολλαγόνου με ενσωματωμένα κύτταρα MeT-5A. Κατά την πειραματική διαδικασία όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονταν σε πάγο. Παρασκευάστηκαν διαλύματα (αραίωση 1:1) 10% FBS-RPMI – PDFs (CAPD, BicaVera, Balance ή Physioneal, αντίστοιχα). Στη συνέχεια, κολλαγόνο προστέθηκε σε κάθε ένα από τα ανωτέρω διαλύματα σε αναλογία 1:6. Τα συνολικά διαλύματα κολλαγόνου εξουδετερώθηκαν με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας NaOH και ενσωματώθηκαν  $10^6$  συγχρονισμένα κύτταρα MeT-5A ανά mL. Η ποσότητα NaOH που διαλύθηκε σε κάθε μείγμα PDF-κολλαγόνου, καθορίστηκε μετά από διαδικασία βελτιστοποίησης (optimization). Τα ολικά μείγματα διαμοιράστηκαν σε μια πλάκα 24 βοθρίων (#662 160, Griener Bio-one) σε ποσότητες των 600  $\mu$ l, το οποίο μεταφέρθηκε στον επωαστήρα για περίπου 30 λεπτά, μέχρι να γίνει πολυμερισμός γέλης. Τότε προστέθηκαν επιπλέον 600  $\mu$ l διαλύματος 10% FBS-RPMI – PDFs αντιστοίχως σε κάθε βοθρίο και οι πλάκες μεταφέρθηκαν ξανά στον επωαστήρα για 72 ώρες. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής η πλάκα σαρώθηκε σε ένα σαρωτή (HP DeskJet 3630) κάθε 24 ώρες μέχρι το τέλος του πειράματος (δηλαδή στις 24, 48, και 72 ώρες). Η πολυμερισμένη γέλη του κάθε βοθρίου μετρήθηκε για να υπολογιστεί η επιφάνειά της χρησιμοποιώντας το ImageJ software με circular lasso tool.

### 11.8 Υπολογισμός ωσμωτικότητας

Μετρήσεις ωσμωτικότητας (mOsm/kg) του διαλύματος επώασης των γελών πραγματοποιήθηκαν στις 24, 48 και 72 ώρες συλλέγοντας 50  $\mu$ l από κάθε βοθρίο και χρησιμοποιώντας ένα κρυοσκοπικό ωσμόμετρο (Osmomat 030, Gonotec, D-10823 Berlin). Στο τέλος του πειράματος (δηλαδή στις 72 ώρες) οι πολυμερισμένες γέλες μεταφέρθηκαν σε 24 σωλήνες Eppendorf και φυγοκεντρήθηκαν στις 5000 rpm για 5 λεπτά (Biofuge fresco, Heraeus). Κατόπιν ο όγκος του υπερκείμενου υγρού εκτιμήθηκε με πιπέτα και 50  $\mu$ l του κάθε δείγματος υποβλήθηκε σε μέτρηση της ωσμωτικότητας.

### 11.9 Ανάλυση δεδομένων

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πακέτο GraphPad Prism v.7.00 statistical software για Mac. Όλα τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσες τιμές  $\pm$  τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (mean  $\pm$  SEM). Τα δεδομένα κάθε πειράματος υποβλήθηκαν σε έλεγχο κανονικότητας με το Shapiro-Wilk normality test προκειμένου να επιλεγούν παραμετρικά ή μη-παραμετρικά τεστ στην περαιτέρω ανάλυση.

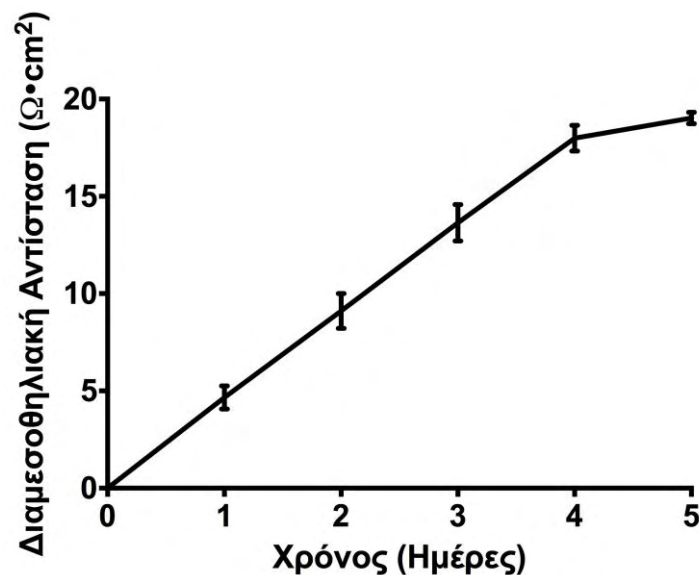
Κατά τις συγκρίσεις μεταξύ των μετρήσεων TER (στα χρονικά σημεία 0, 1, και 5 ώρες) της ίδιας συνθήκης διαλύματος ή της διαμεσοθηλιακής μεταφοράς FITC (%) μεταξύ διαφορετικών συνθηκών διαλύματος, τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με One-way ANOVA και Tukey's multiple comparisons test σε περίπτωση παραμετρικών δεδομένων, ενώ σε αντίθετη περίπτωση, τα μη παραμετρικά δεδομένα αναλύθηκαν με Kruskal-Wallis test και Dunn's multiple comparisons test. Με όμοιο τρόπο εφαρμόστηκαν και οι στατιστικές αναλύσεις για συγκρίσεις που αφορούσαν την επί της εκατό (%) αλλαγή στην επιφάνεια που καταλάμβανε η γέλη κολλαγόνου στην κάθε πειραματική συνθήκη. Οι συγκρίσεις ωσμωτικότητας τόσο του περιβάλλοντος υγρού των πολυμερισμένων γελών όσο και των υγρών που βρισκόντουσαν εντός της γέλης καθώς και οι όγκοι τους πραγματοποιήθηκαν με One-way ANOVA και Tukey's multiple comparisons test. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά όταν το p value ήταν  $p < 0.05$ .



## 12. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 12.1 Διαμεσοθηλιακή ηλεκτρική αντίσταση της MeT-5A μονοστιβάδας

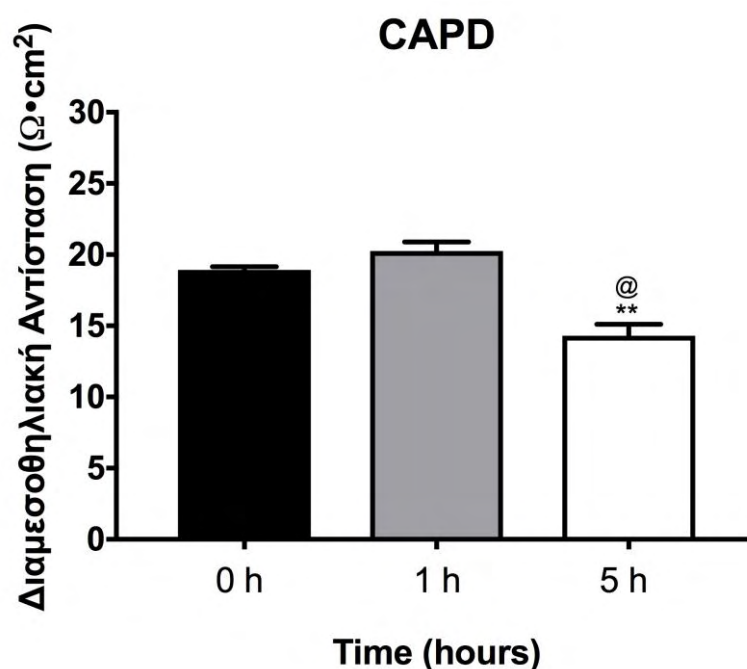
Η ανθρώπινη μεσοθηλιακή κυτταρική σειρά MeT-5A καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα φίλτρου πολυεστέρα με πόρους 0,4  $\mu\text{m}$ . Η μέτρηση της διαμεσοθηλιακής αντίστασης των κυττάρων γινόταν σε καθημερινή βάση ώστε να εκτιμηθεί το χρονικό σημείο που κατά το οποίο η μεσοθηλιακή μονοστιβάδα θα ήταν πλήρης και επομένως η τιμή της αντίστασης θα ήταν σταθερή. Για τον υπολογισμό της τιμής TER μιας μονοστιβάδας έπρεπε να αφαιρεθεί η τιμή που προέκυπτε από τη μέτρηση της TER ενός άδειου φίλτρου Transwell αλλά και να συνυπολογιστεί η επιφάνεια που καταλάμβανε η μονοστιβάδα. Συγκεκριμένα η αντίσταση των κυττάρων της μονοστιβάδας του κάθε φίλτρου κανονικοποιήθηκε σύμφωνα με τον τύπο  $TER_{\text{Final}} = (TER_{\text{Cells}} - TER_{\text{Blank}}) \cdot 0,33$  [επιφάνεια φίλτρου ( $\text{cm}^2$ )] και εκφράστηκε σε  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . Όπως απεικονίζεται και στην **Σχήμα 1** η τιμή της TER παρουσίασε σταθερή αύξηση σε συνάρτηση με το χρόνο, ξεκινώντας από την τιμή 0 και φτάνοντας μέγιστο στα  $19,03 \pm 0,30 \Omega \cdot \text{cm}^2$  ( $n=48$ ). Κατά την 5<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας η τιμή της TER της μονοστιβάδας σταθεροποιήθηκε και έφτασε σε πλατώ, γεγονός που επιβεβαίωσε την συνοχή της μονοστιβάδας που αντικατοπτρίζει την κυτταρική πληρότητα στο φίλτρο υποστήριξης των Transwell.



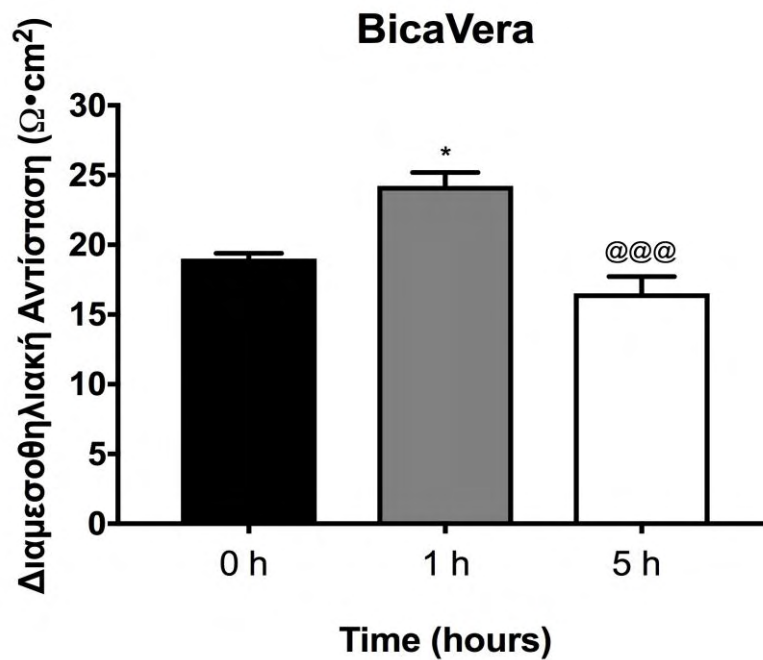
**Σχήμα 1:** Πορεία της διαμεσοθηλιακής αντίστασης μονοστιβάδας MeT-5A καλλιεργημένη σε μεμβρανικό υπόστρωμα πολυεστέρα με πόρους 0,4  $\mu\text{m}$ . Η κανονικοποιημένη TER, η οποία προέκυψε από την αφαίρεση της τιμής TER του κενού φίλτρου Transwell, αυξήθηκε σταθερά ξεκινώντας από την τιμή 0 και φτάνοντας μέγιστο στα  $19,03 \pm 0,30 \Omega \cdot \text{cm}^2$  την 5<sup>η</sup> ημέρα. Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  ( $n=48$ ).

## 12.2 Επιδράσεις της προσθήκης διαλυμάτων περιτοναϊκής κάθαρσης στην TER

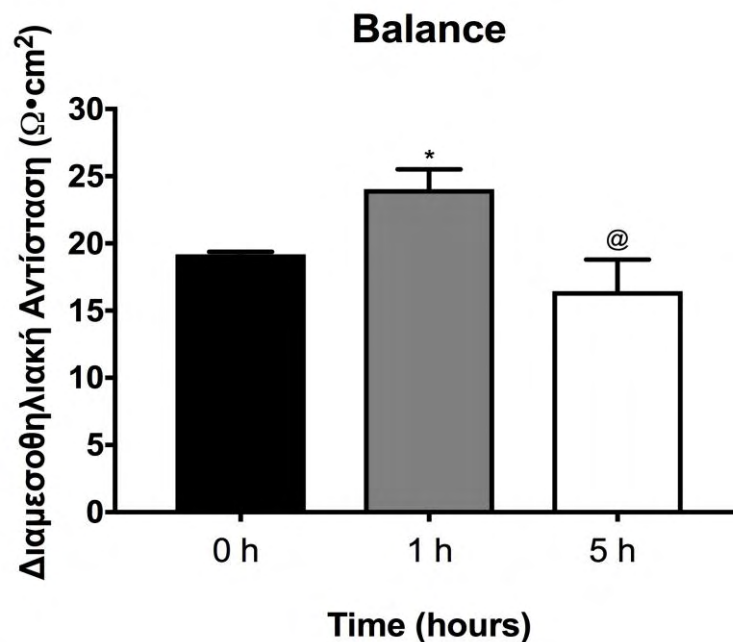
Κατά την 5<sup>η</sup> ημέρα οι μονοστιβάδες των κυττάρων MeT-5A εκτέθηκαν σε διαλύματα περιτοναϊκής κάθαρσης περιεκτικότητας 2,3% w/v γλυκόζης αλλά με διαφορετικούς ρυθμιστικούς παράγοντες (γαλακτικά, διττανθρακικά, ή συνδυασμός τους) και διαφορές στο pH. Η τιμή της TER υπολογίστηκε σε τρία διαφορετικά χρονικά διαστήματα κατά την έκθεση των μονοστιβάδων στα παραπάνω διαλύματα. Συγκεκριμένα στη χρονική στιγμή 0 αμέσως μετά την εισαγωγή των πειραματικών διαλυμάτων, και μετά από 1 και 5 ώρες. Στα **Σχήματα 2** έως **5** αντίστοιχα, φαίνονται οι μεταβολές στην τιμή της TER υπό όλες τις προαναφερθείσες συνθήκες (CAPD, BicaVera, Balance, Physioneal) σε συνάρτηση με το χρόνο.



**Σχήμα 2:** Η TER μετρήθηκε τις χρονικές στιγμές 0 hr ( $18,93 \pm 0,22 \Omega \bullet \text{cm}^2$ ), 1 hr ( $20,25 \pm 0,64 \Omega \bullet \text{cm}^2$ ) και 5 hrs ( $14,30 \pm 0,80 \Omega \bullet \text{cm}^2$ ) κατόπιν καλλιέργειας των MeT-5A κυττάρων με υγρό ΠΚ CAPD. Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  ( $n=7$ ). Η αντίσταση των μονοστιβάδων εμφανίζεται στατιστικώς σημαντικά μειωμένη τη χρονική στιγμή 5 hrs ( $*p < 0.05$  vs. 0 hr,  $@@@p < 0,001$  vs. 1 hr).

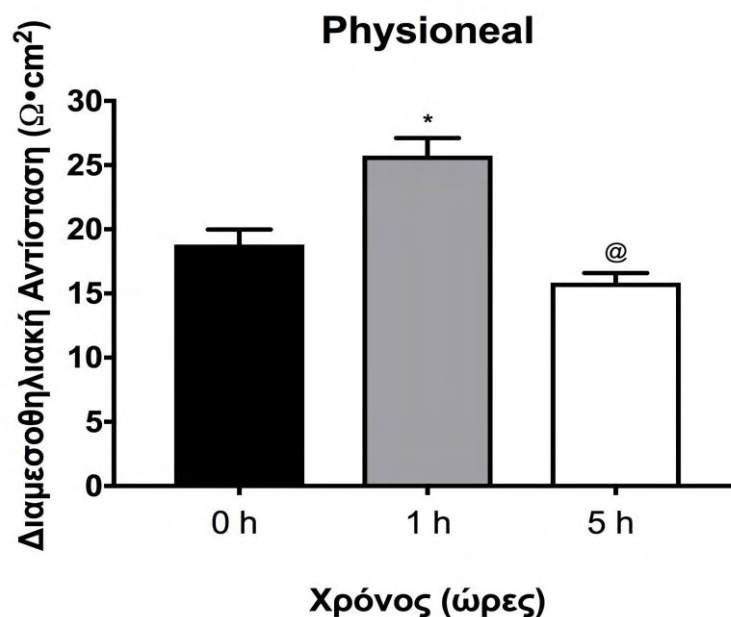


**Σχήμα 3:** Η TER μετρήθηκε τις χρονικές στιγμές 0 hr ( $19,01 \pm 0,38 \Omega \bullet \text{cm}^2$ ), 1 hr ( $24,22 \pm 0,96 \Omega \bullet \text{cm}^2$ ) και 5 hrs ( $16,50 \pm 1,21 \Omega \bullet \text{cm}^2$ ) κατόπιν καλλιέργειας των MeT-5A κυττάρων με υγρό ΠΚ BicaVera. Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  ( $n=10$ ). Η αντίσταση των μονοστιβάδων εμφανίζεται στατιστικώς σημαντικά αυξημένη τη χρονική στιγμή 1 hr ( $**p < 0,01$  vs. 0 hr) και σημαντικά μειωμένη στις 5 hrs ( $@@@p < 0,001$  vs. 1 hr).



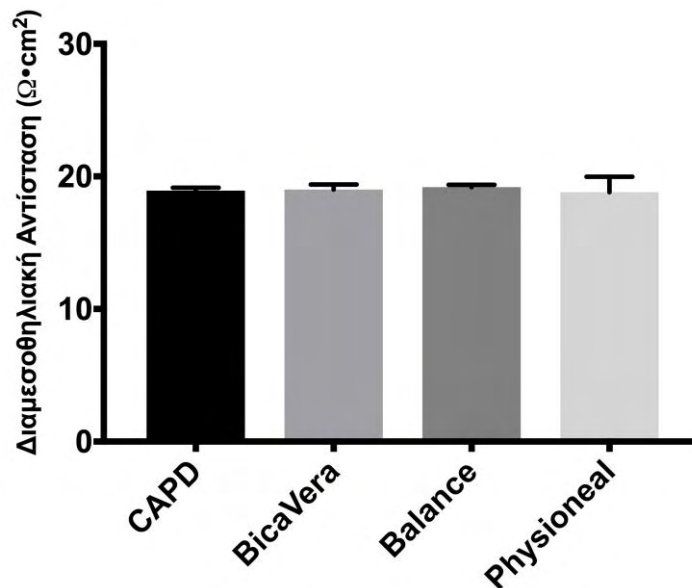
**Σχήμα 4:** Η TER μετρήθηκε τις χρονικές στιγμές 0 hr ( $19,19 \pm 0,18 \Omega \bullet \text{cm}^2$ ), 1 hr ( $24,04 \pm 1,47 \Omega \bullet \text{cm}^2$ ) και 5 hrs ( $16,45 \pm 2,34 \Omega \bullet \text{cm}^2$ ) κατόπιν καλλιέργειας των MeT-5A με υγρό ΠΚ Balance.

Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  ( $n=8$ ). Η αντίσταση των μονοστιβάδων εμφανίζεται στατιστικώς σημαντικά μειωμένη τη στιγμή 5 hrs ( $@p<0,05$  vs. 1 hr).

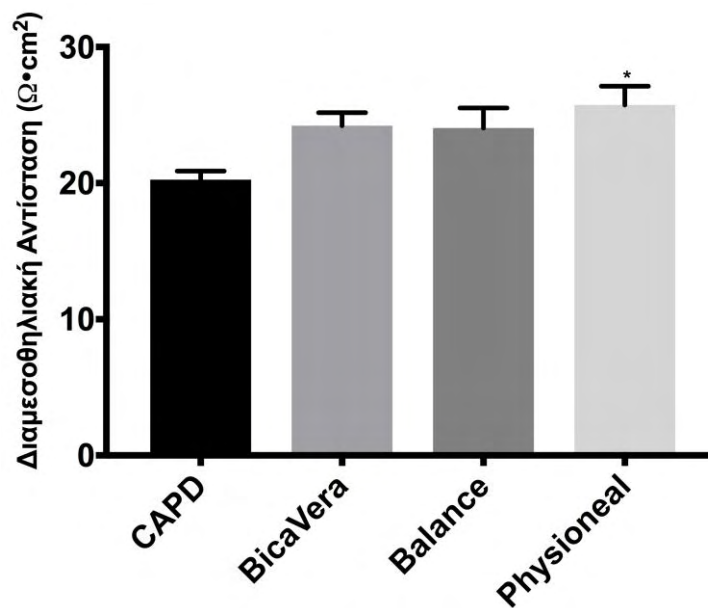


**Σχήμα 5:** Η TER μετρήθηκε τις χρονικές στιγμές 0 hr ( $18,81 \pm 1,17 \Omega \cdot cm^2$ ), 1 hr ( $25,74 \pm 1,37 \Omega \cdot cm^2$ ) και 5 hrs ( $15,84 \pm 0,75 \Omega \cdot cm^2$ ) κατόπιν καλλιέργειας των MeT-5A κυττάρων με υγρό ΠΚ Physioneal. Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  ( $n=4$ ). Η αντίσταση των μονοστιβάδων εμφανίζεται στατιστικώς σημαντικά μειωμένη τη χρονική στιγμή 5 hrs ( $@p<0,05$  vs. 1 hr).

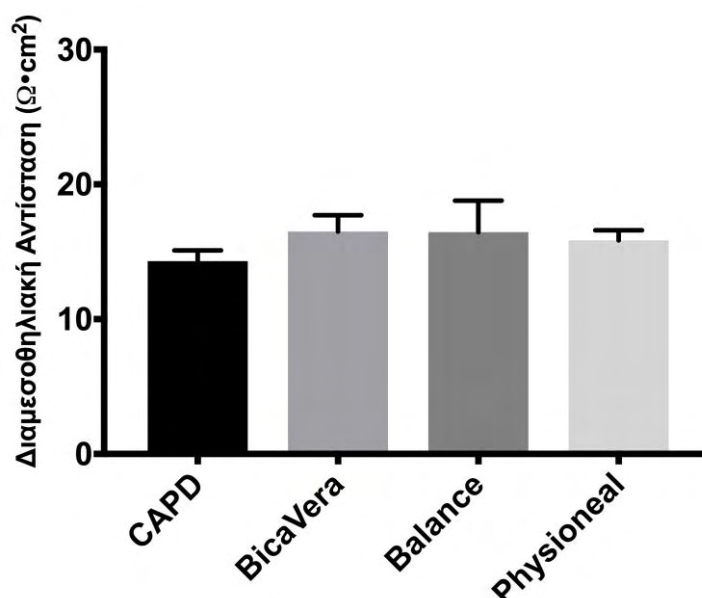
Όταν συγκρίθηκαν οι τιμές TER των βιοσυμβατών διαλυμάτων ΠΚ (BicaVera, Balance, Physioneal) με το CAPD για τις χρονικές στιγμές 0, 1, 5 ώρες βρέθηκε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων υγρών ΠΚ. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Σχήμα 6-8**.



**Σχήμα 6:** Οι τιμές TER των μονοστιβάδων των MeT-5A κυττάρων ανά καλλιέργεια διαφορετικής συνθήκης διαλυμάτων ΠΚ [CAPD (n=7), BicaVera (n=10), Balance (n=8), Physioneal (n=4)] συγκρίθηκαν τη χρονική στιγμή έναρξης του πειράματος (0 h), χωρίς να προκύπτει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά.



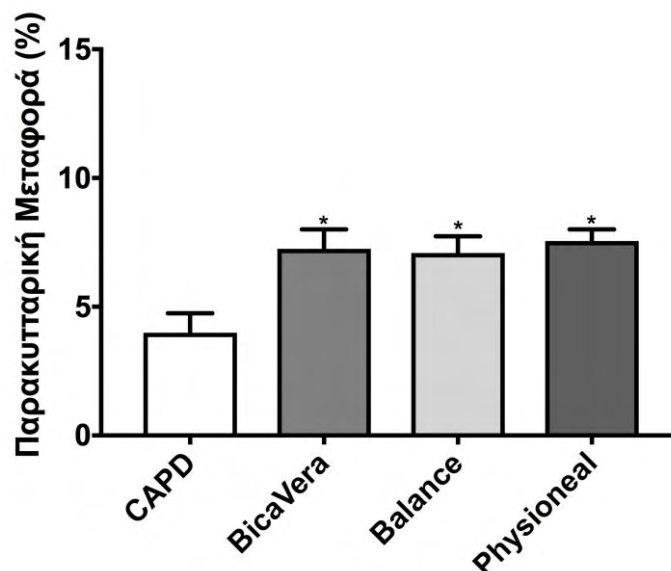
**Σχήμα 7:** Οι τιμές TER των μονοστιβάδων των MeT-5A κυττάρων ανά καλλιέργεια διαφορετικής συνθήκης διαλυμάτων ΠΚ [CAPD (n=7), BicaVera (n=10), Balance (n=8), Physioneal (n=4)] συγκρίθηκαν μια ώρα μετά την έναρξη του πειράματος (1 h). Η TER μόνο του Physioneal ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη από το CAPD (\* $p<0,05$ ).



**Σχήμα 8:** Οι τιμές TER των μονοστιβάδων των MeT-5A κυττάρων ανά καλλιέργεια διαφορετικής συνθήκης διαλυμάτων ΠΚ [CAPD (n=7), BicaVera (n=10), Balance (n=8), Physioneal (n=4)] συγκρίθηκαν τη χρονική στιγμή λήξης του πειράματος (5 h), χωρίς να προκύπτει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά.

### 12.3 Παρακυτταρική μεταφορά της 10-kDa FITC-σημασμένης δεξτράνης

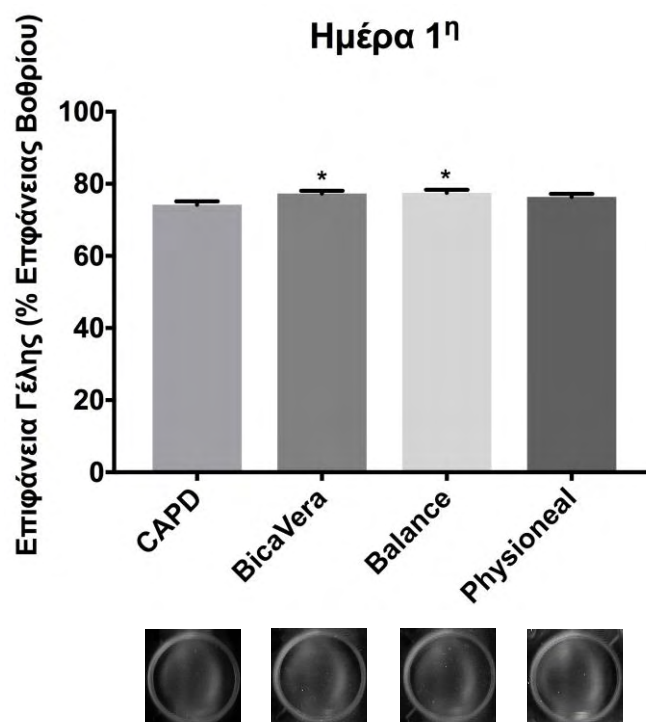
Η διαπερατότητα της μονοστιβάδας των μεσοθηλιακών κυττάρων MeT-5A αξιολογήθηκε μέσω της διάχυσης του μοριακού δείκτη, fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (FITC-labeled δεξτράνη) με μοριακό βάρος 10 kDa ο οποίος τοποθετήθηκε σε γνωστή συγκέντρωση στο άνω διαμέρισμα του θαλάμου Transwell και μετρήθηκε η συγκέντρωση στο κατώτερο διαμέρισμα μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (4 ώρες). Η μέτρηση της έντασης φθορισμού της 10-kDa FITC-σημασμένης δεξτράνης σε θάλαμο από το ανώτερο προς το κατώτερο διαμέρισμα των θαλάμων Transwell οι οποίοι δεν είχαν κύτταρα επί του φίλτρου έδωσε πληροφορίες σχετικά με την παρακυτταρική μεταφορά της ουσίας μόνο μέσω του φίλτρου πολυεστέρα και χρησιμοποιήθηκε σαν πείραμα αναφοράς. Η ένταση φθορισμού της δεξτράνης στα δύο διαμερίσματα των θαλάμων Transwell εκφράστηκε σε επί τοις εκατό ποσοστό παρακυτταρικής μεταφοράς και τα στοιχεία που προέκυψαν από τη σύγκριση των υγρών ΠΚ αναφέρονται στο **Σχήμα 9**, όπου χαρακτηριστικά βλέπουμε πως τα κύτταρα που επώαστηκαν παρουσία των βιοσυμβατών υγρών παρουσίασαν αυξημένο ποσοστό παρακυτταρικής μεταφοράς της δεξτράνης σε σύγκριση με το CAPD.



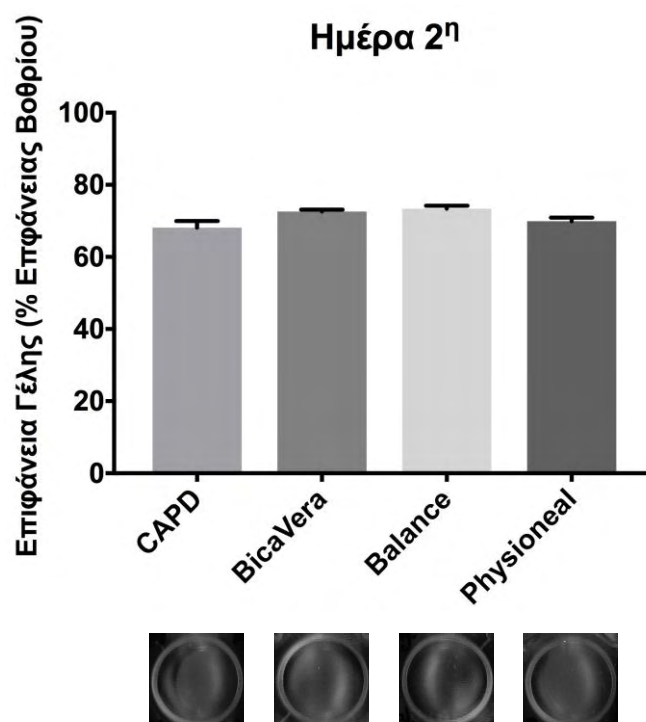
**Σχήμα 9:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε συνθήκη: CAPD:  $3,99 \pm 0,75\%$ , BicaVera:  $7,25 \pm 0,76\%$ , Balance:  $7,09 \pm 0,65\%$ , Physioneal:  $7,55 \pm 0,45\%$ . Στατιστικά σημαντική αύξηση στην (%) παρακυτταρική μεταφορά της 10-kDa FITC-labeled dextran παρατηρήθηκε και στα 3 βιοσυμβατά υγρά ΠΚ που συγκρίθηκαν με το CAPD σε μονοστιβάδες μεσοθηλιακών κυττάρων MeT-5A (\* $p < 0.05$ ).

#### 12.4 Συσταλτότητα γέλης κολλαγόνου με ενσωματωμένα μεσοθηλιακά κύτταρα

Τα συγχρονισμένα MeT-5A κύτταρα ενσωματώθηκαν σε γέλη κολλαγόνου με διαλύματα περιτοναϊκής κάθαρσης και οι γέλες αφέθηκαν να πολυμεριστούν για 3 ημέρες. Κατά τη διάρκεια των τριών ημερών της πειραματικής διαδικασίας, εκτιμήθηκε η συσταλτότητα των μειγμάτων γελών-κυττάρων υπό την επίδραση διαφορετικών διαλυμάτων κάθαρσης (CAPD, BicaVera, Balance, Physioneal) με μέτρηση της επιφάνειας περιοχής της πολυμερισμένης γέλης (24, 48, 72 ώρες). Στα **Σχήματα 10** έως **12** παρουσιάζονται ανά ημέρα οι διαφορές των διαλυμάτων ως προς το (%) μέγεθος της περιοχής γέλης έχοντας σαν συνθήκη αναφοράς το μη-βιοσυμβατό υγρό ΠΚ, CAPD. Για την κάθε συνθήκη ισχύει: control:  $n=15$ , CAPD:  $n=19$ , BicaVera:  $n=18$ , Balance:  $n=14$ , Physioneal:  $n=14$ . Στα **Σχήματα 13-16** παρουσιάζονται οι μεταβολές του μεγέθους της γέλης σε κάθε υγρό ΠΚ σε σχέση με τη μέρα επώασης.

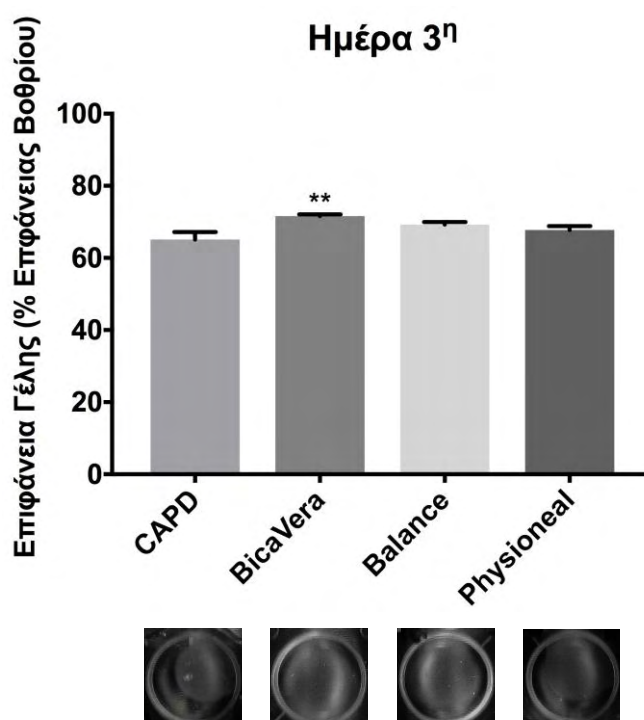


**Σχήμα 10:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε συνθήκη ως % επιφάνεια σε σχέση με την επιφάνεια του βοθρίου: CAPD:  $74,18 \pm 0,97$ , BicaVera:  $77,31 \pm 0,76$ , Balance:  $77,51 \pm 0,82$ , Physioneal:  $76,38 \pm 0,83$ . Την 1<sup>η</sup> ημέρα (24 ώρες) τα MeT-5A κύτταρα σε γέλη κολλαγόνου που περιείχε BicaVera και Balance εμφάνισαν μεγαλύτερη περιοχή γέλης συγκριτικά με το CAPD (\* $p < 0,05$ ).

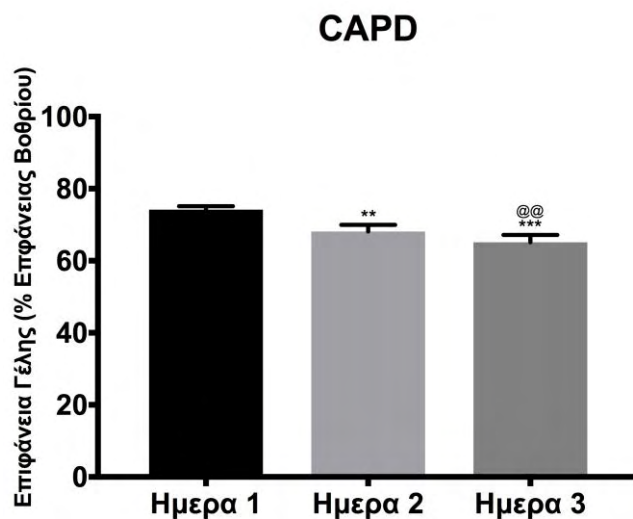




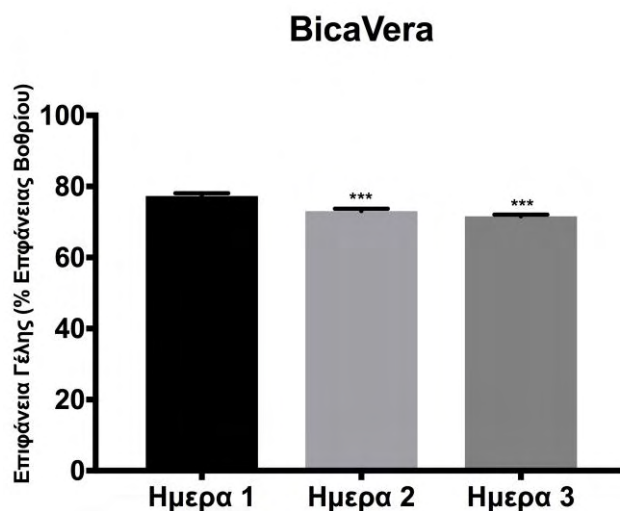
**Σχήμα 11:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε συνθήκη ως % επιφάνεια σε σχέση με την επιφάνεια του βοθρίου: CAPD:  $68,11 \pm 1,83$ , BicaVera:  $72,61 \pm 0,53$ , Balance:  $73,40 \pm 0,81$ , Physioneal:  $69,93 \pm 0,95$ . Τη 2<sup>η</sup> ημέρα (48 ώρες) τα MeT-5A κύτταρα σε κάθε γέλη κολλαγόνου δεν εμφάνισαν διαφορές συγκριτικά με το CAPD.



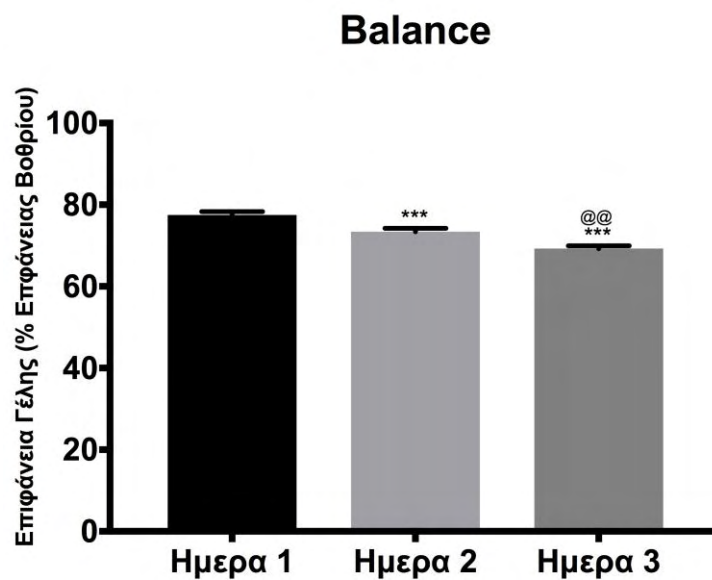
**Σχήμα 12:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε συνθήκη ως % επιφάνεια σε σχέση με την επιφάνεια του βοθρίου: CAPD:  $68,11 \pm 1,83$ , BicaVera:  $72,61 \pm 0,53$ , Balance:  $73,40 \pm 0,81$ , Physioneal:  $69,93 \pm 0,95$ . Την 3<sup>η</sup> ημέρα (72 ώρες) μόνο τα MeT-5A κύτταρα σε γέλη κολλαγόνου που περιείχε BicaVera εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη περιοχή γέλης σε σύγκριση με το CAPD (\*\* $p < 0,01$ ).



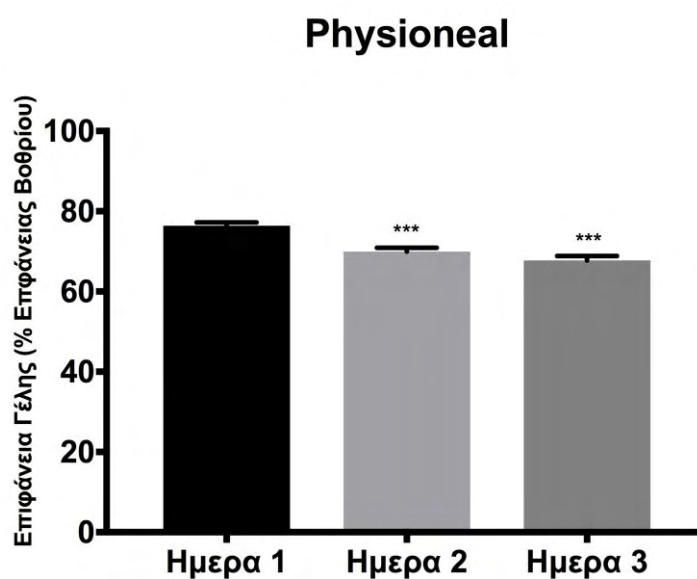
**Σχήμα 13:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε συνθήκη ως % επιφάνεια σε σχέση με την επιφάνεια του βοθρίου. Σε σύγκριση με την 1<sup>η</sup> ημέρα η επιφάνεια της γέλης ήταν σημαντικά μικρότερη την 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα (\*\* $p < 0,01$  και \*\*\* $p < 0,001$  αντίστοιχα), ενώ υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> μέρας(@@  $p < 0,01$ ).



**Σχήμα 14:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε συνθήκη ως % επιφάνεια σε σχέση με την επιφάνεια του βοθρίου. Σε σύγκριση με την 1<sup>η</sup> ημέρα η επιφάνεια της γέλης ήταν σημαντικά μικρότερη την 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα (\*\*\* $p < 0,001$ ).



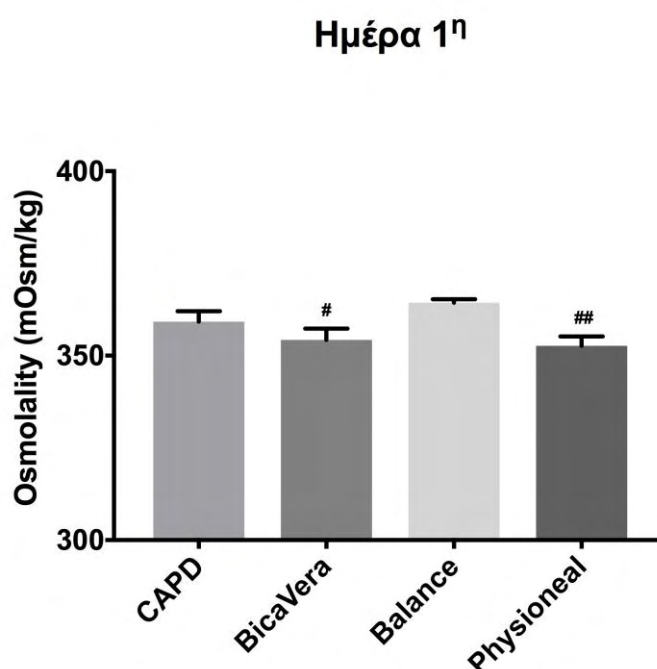
**Σχήμα 15:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε συνθήκη ως % επιφάνεια σε σχέση με την επιφάνεια του βοθρίου. Σε σύγκριση με την 1<sup>η</sup> ημέρα η επιφάνεια της γέλης ήταν σημαντικά μικρότερη την 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα ( $***p < 0,001$ ).



**Σχήμα 16:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε συνθήκη ως % επιφάνεια σε σχέση με την επιφάνεια του βοθρίου. Σε σύγκριση με την 1<sup>η</sup> ημέρα η επιφάνεια της γέλης ήταν σημαντικά μικρότερη την 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα ( $***p < 0,001$ ).

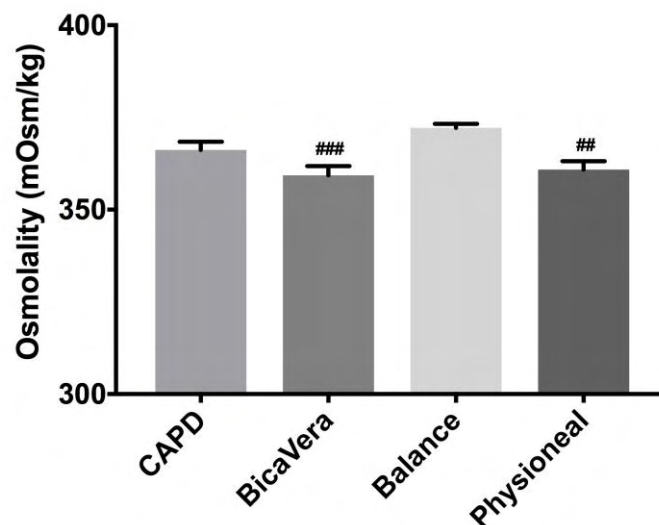
## 12.5 Μετρήσεις ωσμωτικότητας υγρών ΠΚ που επώαστηκαν οι γέλες κολλαγόνου με τα ενσωματωμένα μεσοθηλιακά κύτταρα MeT-5A.

Στα πειράματα της συστολής γέλης κολλαγόνου, εκτός από τις διαφορές της περιοχής γέλης, υπολογίστηκαν επίσης και οι διαφορές της ωσμωτικότητας του περιβάλλοντος θρεπτικού υλικού (conditioned media) το οποίο περιείχε διαλύματα ΠΚ σε αναλογία 1:1. Οι μετρήσεις ωσμωτικότητας (mOsm/kg) πραγματοποιήθηκαν κατά το διάστημα των 3 ημερών της πειραματικής διαδικασίας (24 hrs, 48 hrs, 72 hrs) και τα αποτελέσματα των συγκρίσεων με το διάλυμα control ή των διαλυμάτων κάθαρσης μεταξύ τους παρατίθενται στα **Σχήματα 17** έως **19**. Στα **Σχήματα 20-23** απεικονίζονται οι μεταβολές της ωσμωτικότητας των υγρών ΠΚ που επώαστηκαν οι γέλες σε σχέση με τις μέρες επώασης.



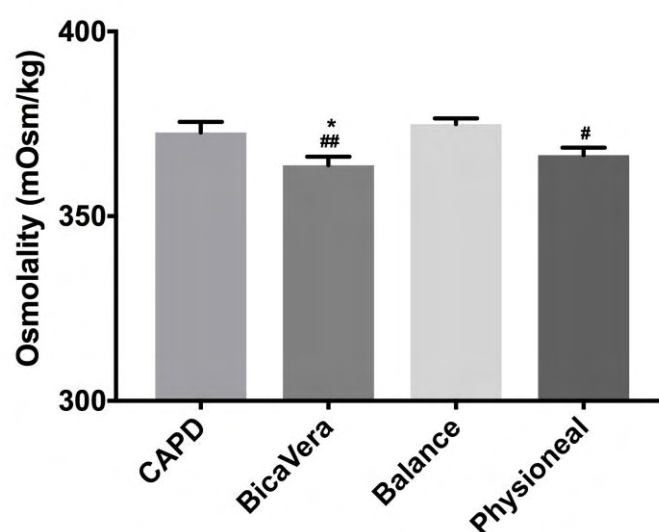
**Σχήμα 17:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε συνθήκη: CAPD:  $359,20 \pm 2,83$ , BicaVera:  $354,30 \pm 3,08$ , Balance:  $364,40 \pm 0,92$ , Physioneal:  $352,70 \pm 2,52$ . Την 1<sup>η</sup> ημέρα (24 ώρες) οι τιμές ωσμωτικότητας όλων των διαλυμάτων ΠΚ δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με το CAPD. Η ωσμωτικότητα του διαλύματος Balance ήταν επιπλέον υψηλότερη και συγκριτικά με το BicaVera ( $^{\#}p < 0,05$ ) και το Physioneal ( $^{##}p < 0,01$ ).

### Ημέρα 2<sup>η</sup>



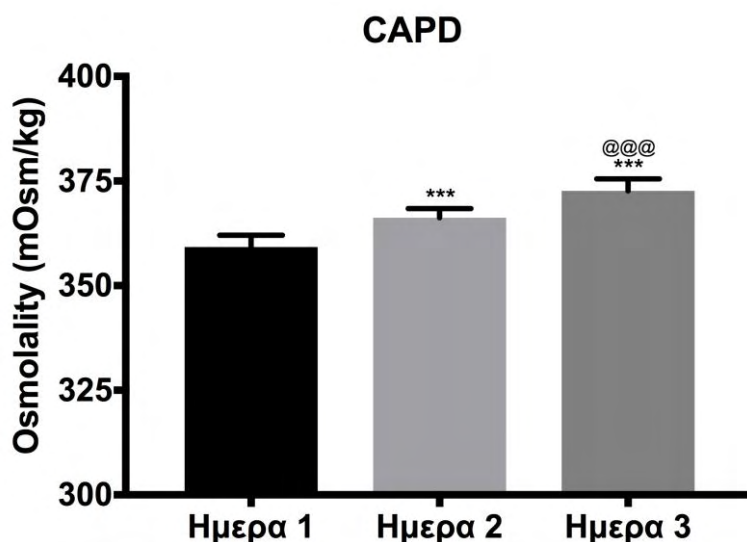
**Σχήμα 18:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε συνθήκη: CAPD:  $366,20 \pm 2,21$ , BicaVera:  $359,30 \pm 2,48$ , Balance:  $372,20 \pm 1,09$ , Physioneal:  $360,80 \pm 2,30$ . Τη 2<sup>η</sup> ημέρα (48 ώρες) οι τιμές ωσμωτικότητας όλων των διαλυμάτων ΠΚ δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με το CAPD. Η ωσμωτικότητα του διαλύματος Balance ήταν επιπλέον υψηλότερη και συγκριτικά με το BicaVera (### $p < 0,001$ ) και το Physioneal (## $p < 0,01$ ).

### Ημέρα 3<sup>η</sup>

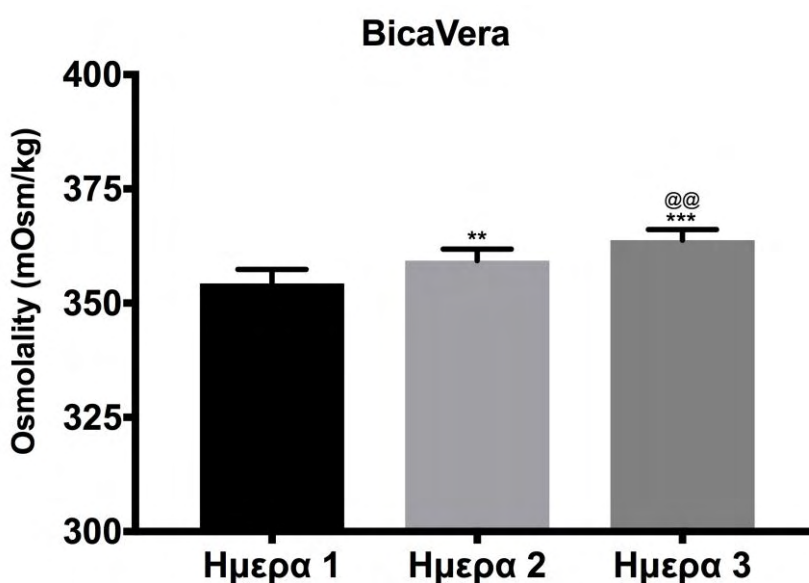


**Σχήμα 19:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε συνθήκη: CAPD:  $372,60 \pm 2,87$ , BicaVera:  $363,80 \pm 2,29$ , Balance:  $374,90 \pm 1,59$ , Physioneal:  $366,50 \pm 2,03$ . Την 3<sup>η</sup>

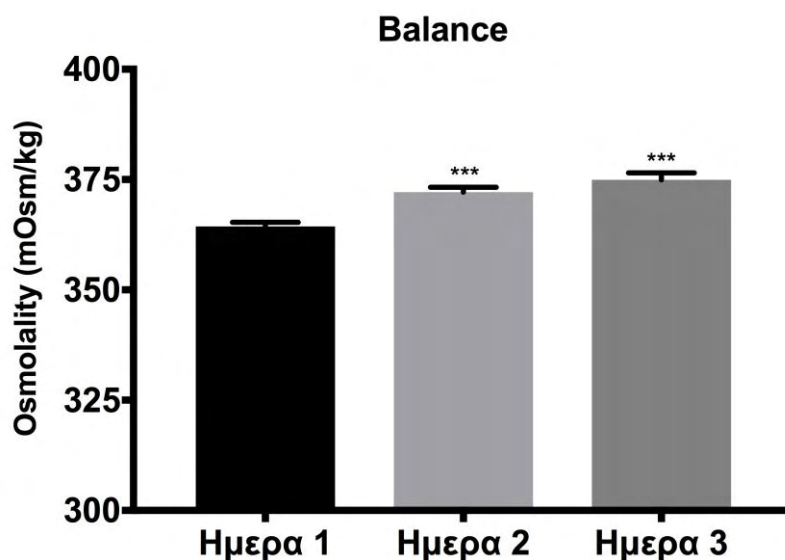
ημέρα (72 ώρες) οι τιμές ωσμωτικότητας του CAPD ήταν υψηλότερες σε σύγκριση με το BicaVera (\* $p<0,05$ ), ενώ το Balance ότι εμφάνισε υψηλότερη ωσμωτικότητα τόσο συγκριτικά με το BicaVera ( $^{##}p<0,01$ ) όσο και με το Physioneal ( $^{#}p<0,5$ ).



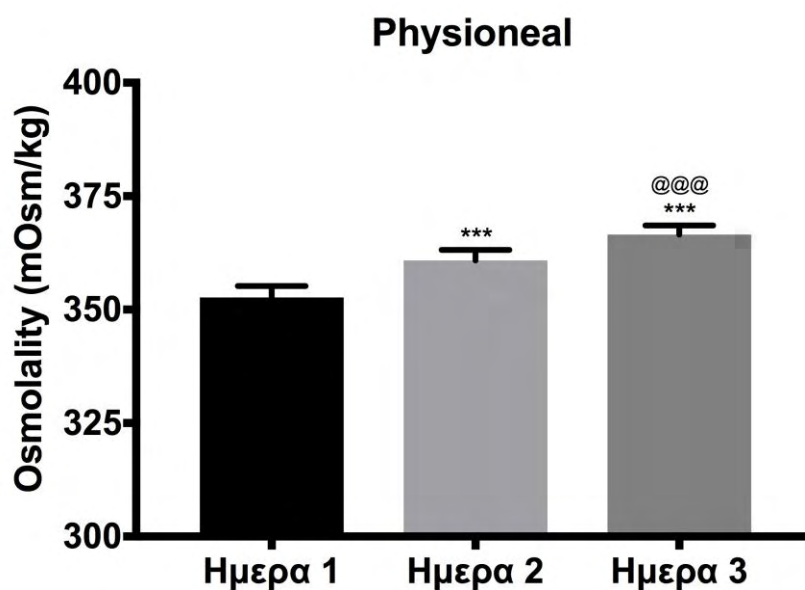
**Σχήμα 20:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε ωσμωτικότητα του CAPD με το οποίο επώαστησαν οι γέλες κολλαγόνου με ενσωματωμένα κύτταρα MeT-5A. Σε σύγκριση με την 1<sup>η</sup> ημέρα η ωσμωτικότητα ήταν σημαντικά αυξημένη την 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα ( $^{***}p<0,001$ ), ενώ υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> μέρας ( $^{@@@}p<0,001$ ).



**Σχήμα 21:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε ωσμωτικότητα του *BicaVera* με το οποίο επωάστησαν οι γέλες κολλαγόνου με ενσωματωμένα κύτταρα *MeT-5A*. Σε σύγκριση με την 1<sup>η</sup> ημέρα η ωσμωτικότητα ήταν σημαντικά αυξημένη την 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα ( $**p < 0,01$  και  $***p < 0,001$  αντίστοιχα), ενώ υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> μέρας( $@@p < 0,01$ ).



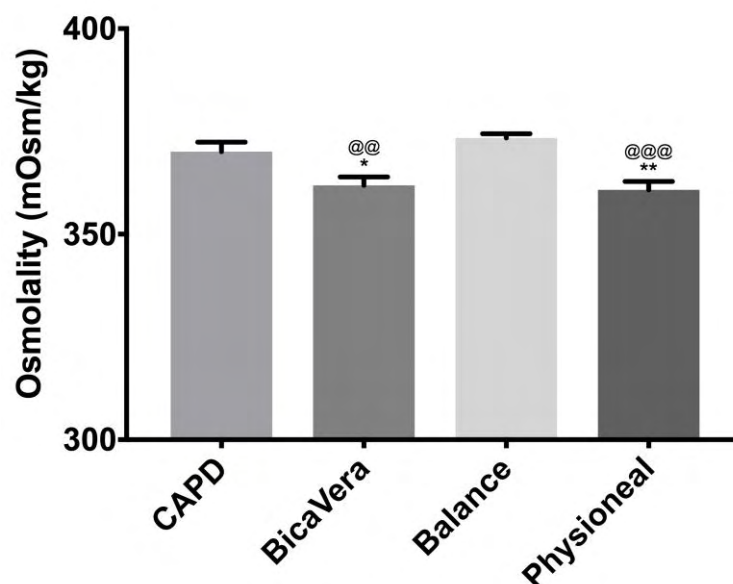
**Σχήμα 22:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε ωσμωτικότητα του *Balance* με το οποίο επωάστησαν οι γέλες κολλαγόνου με ενσωματωμένα κύτταρα *MeT-5A*. Σε σύγκριση με την 1<sup>η</sup> ημέρα η ωσμωτικότητα ήταν σημαντικά αυξημένη την 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα ( $***p < 0,001$ ).



**Σχήμα 23:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε ωσμωτικότητα του *Physioneal* με το οποίο επωάστησαν οι γέλες κολλαγόνου με ενσωματωμένα κύτταρα *MeT-5A*. Σε σύγκριση με την 1<sup>η</sup> ημέρα η ωσμωτικότητα ήταν σημαντικά αυξημένη την 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα ( $***p < 0,001$ ), ενώ υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> μέρας ( $@@@p < 0,001$ ).

## 12.6 Ωσμωτικότητα και περιεχόμενος όγκος υγρού ανά πολυμερισμένη γέλη κολλαγόνου

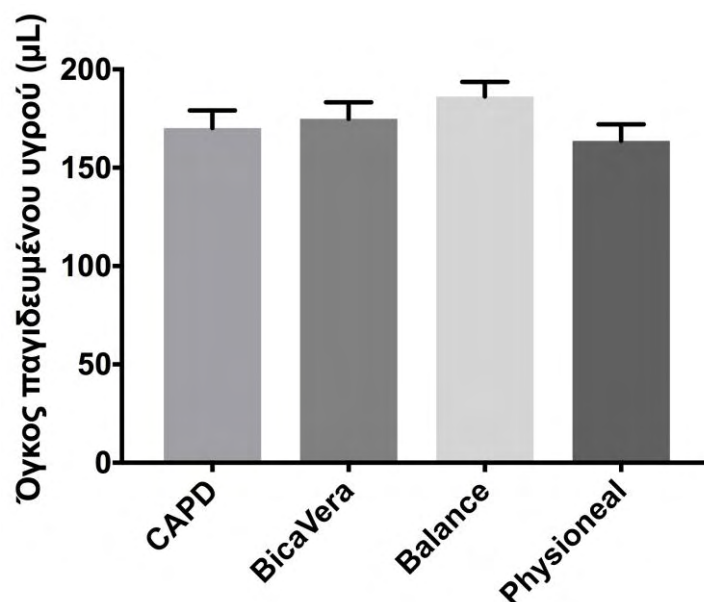
Στο τέλος του πειράματος της συστολής γέλης κολλαγόνου φυγοκεντρήθηκαν οι πολυμερισμένες γέλες, και το προκύπτον υγρό που ήταν παγιδευμένο μέσα στην κάθε γέλη υποβλήθηκε σε μέτρηση της ωσμωτικότητας. Τα υγρά γέλης διαφορετικών διαλυμάτων κάθαρσης συγκρίθηκαν μεταξύ τους (Σχήμα 24).



**Σχήμα 24:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε συνθήκη: CAPD: 370,10 ± 2,32, BicaVera: 361,90 ± 2,03, Balance: 373,40 ± 1,02, Physioneal: 360,80 ± 2,04. Επιπλέον, τα υγρά γέλης με περιεχόμενο CAPD είχαν σημαντικά υψηλότερη ωσμωτικότητα από το BicaVera (\* $p < 0,05$ ) και Physioneal (\*\* $p < 0,05$ ), και τα υγρά γέλης με περιεχόμενο Balance εμφάνισαν υψηλότερη ωσμωτικότητα σε σύγκριση με το BicaVera και το Physioneal (@@ $p < 0,01$ , @@@ $p < 0,001$ ).



Επίσης ο όγκος του υπερκείμενου υγρού κατόπιν φυγοκεντρήσεως των πολυμερισμένων γελών μετρήθηκε με πιπέττα, και εκφραζόμενος σε μl συγκρίθηκε μεταξύ των διαλυμάτων κάθαρσης. Όπως διαπιστώνεται και από το **Σχήμα 25**, σε όλες τις συνθήκες ο όγκος του παγιδευμένου υγρού δεν είναι σημαντικά διαφορετικός.



**Σχήμα 25:** Οι τιμές παρουσιάζονται ως  $mean \pm SEM$  και ισχύει για την κάθε συνθήκη: CAPD:  $170,20 \pm 8,96$ , BicaVera:  $174,90 \pm 8,38$ , Balance:  $186,20 \pm 7,47$ , Physioneal:  $163,70 \pm 8,34$ . Δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των όγκων των υγρών ΠΚ των γελών.

### 13. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αναφερόμενα ως «συμβατικά» ή αλλιώς «μη-βιοσυμβατά» διαλύματα περιτοναϊκής κάθαρσης περιέχουν ως ωσμωτικό παράγοντα τη γλυκόζη σε διάφορες συγκεντρώσεις, προκειμένου να επιτύχουν αυξημένη ωσμωτική κλίση με σκοπό την υπερδιήθηση, χαμηλό pH για την αποφυγή της «καραμελοποίησης» κατά τη θερμική αποστείρωση των διαλυμάτων και γαλακτικό οξύ ως ρυθμιστικό διάλυμα για τη διόρθωση της μεταβολικής οξέωσης. Κατά τη θερμική αποστείρωση των συμβατικών PDFs, η D-γλυκόζη αποικοδομείται σε ένα φάσμα ενώσεων καρβονυλίου που ονομάζονται GDPs και οι οποίες τείνουν να παράγουν AGEs. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν θεωρηθεί επιζήμια για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα της περιτοναϊκής μεμβράνης, με αποτέλεσμα η μακροπρόθεσμη κλινική έκβαση της μεθόδου της ΠΚ να οδηγεί μεταξύ άλλων, σε διάχυτη ίνωση και σκλήρυνση του περιτοναίου (104).

Το μεσοθήλιο της περιτοναϊκής μεμβράνης αποτελεί το σημείο διεπαφής μεταξύ του διαμερίσματος κάθαρσης και των υπομεσοθηλιακών δομών της περιτοναϊκής μεμβράνης. Ως εκ τούτου, η μεσοθηλιακή μονοστιβάδα χρησιμεύει ως μηχανικός φραγμός, ενώ συγχρόνως έχει και ενεργό ρόλο σε βιολογικές διαδικασίες μεταφοράς ύδατος και διαλυμένων ουσιών, σε φλεγμονώδεις και συνθετικές αποκρίσεις κατά τη διέγερση από επιβλαβή ερεθίσματα. Η απόδειξη αυτού έχει επέλθει από μελέτες που αξιολόγησαν τη βλαπτική επίδραση των GDPs και AGEs, τα οποία άμεσα μειώνουν την κυτταρική επιβίωση, αλλάζουν τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και αυξάνουν την έκφραση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων (π.χ. TGF-β, eNOS, VEGF) (105). Σε αυτό πλαίσιο, τα μέχρι σήμερα δεδομένα δείχνουν ότι η απώλεια ή ο εκφυλισμός του μεσοθηλίου καθώς και η διαμόρφωση της έκκρισης κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων από μεσοθηλιακά κύτταρα αποτελούν σημαντικά βήματα για την έναρξη της ίνωσης του περιτοναίου και της αγγειογένεσης (106).

Τα βιβλιογραφικά ευρήματα που στοιχειοθετούν την παρατεταμένη έκθεση σε PDFs ως κύρια αιτία αλλοίωσης της περιτοναϊκής μεμβράνης ολοένα και αυξάνονται. Οι επιπλοκές που αποδίδονται στα PDFs σχετίζονται με δομικές και λειτουργικές αλλοιώσεις της περιτοναϊκής μεμβράνης τόσο σε επίπεδο μεσοθηλιακής στιβάδας αλλά και σε αλλοιώσεις της υπομεσοθηλιακής ζώνης του περιτοναίου (106). Πιο συγκεκριμένα, παροδικά η μεσοθηλιακή στιβάδα μετά από συνεχόμενους τραυματισμούς των κυττάρων δεν επαναμεσοθηλιοποιείται αλλά και πιθανότατα, πληθυσμοί μεσοθηλιακών κυττάρων μέσω διαδικασίας μεσοθηλιακής-προς-μεσεγγυματικής μετάβασης διαφοροποιούνται σε μυοϊνοβλάστες και διηθούν το χόριο της μεμβράνης παράγοντας μεγάλες ποσότητες συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας οδηγώντας σε πάχυνση και ίνωση της μεμβράνης. Παράλληλα παρατηρείται προοδευτική νεοαγγειογένεση που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διαθέσιμης επιφάνειας για ανταλλαγή ύδατος και

διαλυμένων ουσιών με αποτέλεσμα να επέρχεται απώλεια υπερδιήθησης και αποτυχία της θεραπείας. Η μειωμένη ανταλλαγή ύδατος και διαλυμένων ουσιών και κατ' επέκταση απώλεια της υπερδιήθησης είναι μία από τις μείζονες επιπλοκές της μακροχρόνιας ΠΚ. Η διαδικασία αυτή μπορεί να επιταχυνθεί σε περιπτώσεις περιτονίτιδας του ασθενούς (4,107,108). Σε μια τέτοια περίπτωση που τυπικά απαιτεί κατά μέσο όρο 6 χρόνια για να εγκαθιδρυθεί, ο ασθενής θα πρέπει να αλλάξει σε θεραπεία αιμοκάθαρσης. Ωστόσο, παρά την πληθώρα των μελετών που έχουν γίνει στο πεδίο της ΠΚ, οι περισσότερες αναφορές για τις επιδράσεις των PDFs στα μεσοθηλιακά κύτταρα έχουν βασιστεί σε πειράματα που συγκρίνουν συνήθως τα συμβατικά PDFs με ένα βιοσυμβατό σε σχέση με επιδράσεις τους στην κυτταροτοξικότητα, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την παραγωγή κυτταροκινών. Ελάχιστες είναι οι μελέτες που έχουν διερευνήσει την επίδραση των PDFs στην διαπερατότητα της μεσοθηλιακής μονοστιβάδας της περιτοναϊκής μεμβράνης. Σε αυτές τις μελέτες έχουν περιγραφεί πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων όπου μελετήθηκε η επίδραση της γλυκόζης (σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές των PDFs) στα συστατικά των στεγανών συνδέσμων (claudin-1, claudin-2, ZO-1, occludin) και στα συστατικά των μορίων πρόσφυσης ( $\beta$ -catenin και E-cadherin). Βρέθηκε πως η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης μειώνει την έκφραση τους μέσω δράσης του παράγοντα TGF- $\beta$  και πως παρόμοια δράση έχει το αυξημένο οξειδωτικό στρες. Οι αλλαγές αυτές συνοδεύτηκαν και από αντίστοιχη μείωση στην διαμεσοθηλιακή αντίσταση (TER) μονοστιβάδων σε ημιπερατά φίλτρα (109,110). Δεν έχουν γίνει όμως αντίστοιχες μελέτες που να εξετάζουν διαφορές σε πειράματα με χρήση των εμπορικών PDFs προκειμένου να διαπιστωθεί εάν στο επίπεδο της διαμεσοθηλιακής διαπερατότητας υπάρχουν διαφορές.

Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε τις επιδράσεις των εμπορικά διαθέσιμων PDFs CAPD, BicaVera, Balance και Physioneal στην TER μονοστιβάδων ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων MeT-5A, κατόπιν επώασης τους με τα τέσσερα παραπάνω PDFs. Η TER σε μονοστιβάδες μεσοθηλιακών κυττάρων είναι μέτρο της διαμεσοθηλιακής ιοντικής διαπερατότητας συμπεριλαμβανομένης της διακυτταρικής και παρακυτταρικής οδού. Κυρίως όμως αντανakλούν την παρακυτταρική διαπερατότητα της μονοστιβάδας και έχειδειχθεί σε πολλές προηγούμενες μελέτες μια σαφής συσχέτιση μεταξύ μείωσης των τιμών TER και αύξησης της διαπερατότητας διαλυμένων ουσιών σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων μέσω της παρακυτταρικής οδού (111–113). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων TER κατά την επώαση των κυττάρων με τα PDFs δείχνουν πως στην περίπτωση των βιοσυμβατών PDFs η αντίσταση αυξάνεται στατιστικά σημαντικά σε σχέση τις τιμές αναφοράς (0h) και ακολουθεί μια στατιστικά σημαντική μείωση της TER στο τέλος του πειράματος (5h) σε σχέση με την 1<sup>η</sup> ώρα

μετά την επώαση. Στην περίπτωση του συμβατικού PDF η τιμή της TER στη 1 ώρα μετά την επώαση δεν αυξάνεται σημαντικά ενώ στις 5 ώρες η τιμή της είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τις τιμές αναφοράς και τις τιμές της 1 ώρας μετά την επώαση. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η μείωση από την 1<sup>η</sup> ώρα έως την 5<sup>η</sup> ώρα είναι σχεδόν διπλάσια στα βιοσυμβατικά PDFs σε σχέση με το συμβατικό PDF. Συγκρίνοντας τις τιμές των διαφορετικών PDFs σε κάθε χρονικό σημείο μέτρησης της TER, η μόνη σημαντική διαφορά μεταξύ τους παρατηρήθηκε στην αύξηση της TER μεταξύ του CAPD και του Physioneal στη 1 ώρα. Επομένως η επίδραση των PDFs σε κάθε χρονικό σημείο διαφέρει μόνο στο γεγονός πως τα βιοσυμβατά διαλύματα οδηγούν σε σημαντική άμεση αύξηση στη 1 ώρα επώασης και στις 5 ώρες οι τιμές της είναι συγκρίσιμες με τις τιμές αναφοράς, ενώ στην περίπτωση του συμβατικού PDF δεν παρατηρείται άμεση μείωση στην 1<sup>η</sup> ώρα αλλά σημαντική μείωση στην 5<sup>η</sup> ώρα σε σχέση με τις τιμές αναφοράς. Δεδομένου ότι ένα διαφορετικό χαρακτηριστικό του CAPD είναι το όξινο pH (~5), σε σχέση με το φυσιολογικό των BicaVera (pH = 7,4), Balance (pH = 7), Physioneal (pH = 7,4), η παρατήρηση αυτή ίσως να μπορούσε να αποδοθεί στο χαμηλό pH, καθώς έχει δείχθει πως είναι κυτταροτοξικό για τα μεσοθηλιακά κύτταρα (96). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της TER επιβεβαιώνονται και από τις μετρήσεις παρακυτταρικής μεταφοράς πράσινης φθορίζουσας δεξτράνης 10 kDa που τοποθετήθηκε στους θαλάμους 1 ώρα μετά την έναρξη της επώασης και δείχθηκε πως η μεταφορά της από το κορυφαίο προς το βασηοπλευρικό διαμέρισμα του θαλάμου Transwell ήταν σημαντικά αυξημένη στα βιοσυμβατά PDFs σε σχέση με το συμβατικό PDF. Η μειωμένη παρακυτταρική διαπερατότητα της μονοστιβάδας που επώαστηκε με το CAPD πιθανότατα σχετίζεται με την μικρότερου βαθμού μείωση της TER από την 1<sup>η</sup> ως την 5<sup>η</sup> ώρα επώασης. Η επιλογή δεξτράνης μεγέθους 10 kDa έγινε για να εκτιμηθεί η διαπερατότητα σε πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους όπως η β2-μικροσφαιρίνη (12 kDa) που αποτελεί μια εκ των ουραιμικών τοξινών μεσαίου μοριακού βάρους σε ασθενείς υπό θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας.

Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν υπάρχουν μελέτες που να εξετάζουν την επίδραση των εμπορικά διαθέσιμων PDFs που χρησιμοποιήσαμε στην διαπερατότητα του περιτοναϊκού μεσοθηλίου για να συγκρίνουμε τα ευρήματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Σε σχέση με μελέτες που εξέτασαν το συμβατικό PDF σε αναλογία 1:1 με θρεπτικό υλικό και με προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ως οξειδωτικό παράγοντα φάνηκε πως η TER μειώθηκε σημαντικά την πρώτη ώρα και παράλληλα αυξήθηκε η παρακυτταρική μεταφορά δεξτράνης FITC 10 kDa σημαντικά σε σχέση με το πείραμα αναφοράς (93, 105).

Η εγγύτητα των περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων στον υποκείμενο ιστό καθιστά τη θέση τους ιδανική για να ανταποκρίνονται σε κυτοκίνες, χημειοκίνες και αυξητικούς παράγοντες

που εκκρίνονται από ινοβλάστες κατά τη διάρκεια του τραυματισμού, της λοίμωξης ή της φλεγμονής της περιτοναϊκής μεμβράνης. Ο TGF- $\beta$  είναι ένας κρίσιμος μεσολαβητής του MMT και ενεργεί ως κύριος διακόπτης για επαγωγή της ίνωσης σε πολλά όργανα, συμπεριλαμβανομένου του περιτοναίου (98,114). Η μετάβαση των περιτοναϊκών μεσοθηλιακών κυττάρων σε μυοϊνοβλάστες και η επακόλουθη μετανάστευση τους συμβαίνουν *in vitro* σε απόκριση του TGF- $\beta$  και μπορεί να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της περιτοναϊκής ίνωσης κατά την ΠΚ (96,115). Ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για τη συγκεκριμένη μετατροπή δεν είναι εξακριβωμένος, αλλά φαίνεται να περιλαμβάνει τα συμβατικά διαλύματα περιτοναϊκής κάθαρσης και τα επαναλαμβανόμενα επεισόδια περιτονίτιδας. Προκειμένου να αποσαφηνιστεί η επιρροή των PDFs στον MMT φαινότυπο πραγματοποιήσαμε πειράματα δοκιμής συστολής γέλης κολλαγόνου με ενσωματωμένα μεσοθηλιακά κύτταρα MeT-5A. Η δοκιμή συστολής γέλης κολλαγόνου είναι μια μέθοδος εκτίμησης της συσταλτότητας των κυττάρων που περιέχονται στη γέλη σε απόκριση διάφορων ερεθισμάτων (116). Ο γέλης με τα MeT-5A εκτέθηκαν για 3 ημέρες στα PDFs και καθημερινά γινόταν μέτρηση της επιφάνειας της γέλης σε σχέση με την αρχική επιφάνεια (ίση με την επιφάνεια του βοθρίου μικροπλάκας) καθώς και μέτρηση ωσμωτικότητας του περιβάλλοντος υγρού. Την 3<sup>η</sup> μέρα επιπλέον μετρήθηκε όγκος του υγρού που ήταν παγιδευμένο στη γέλη καθώς και η ωσμωτικότητά του. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως συγκρίνοντας καθημερινά τις επιφάνειες των γελών προέκυψε πως το BicaVera ήταν το PDF που επήγαγε σημαντικά μικρότερη συστολή σε σχέση με το CAPD, ενώ τα Balance και Physioneal δεν διέφεραν από το CAPD. Εκτιμώντας την προοδευτική συστολή της γέλης κάθε μέρα είναι εμφανές πως τα υγρά που περιέχουν γαλακτικό σαν ρυθμιστικό διάλυμα (CAPD και Balance) κατά την 3<sup>η</sup> μέρα παρουσίαζαν σημαντικά αυξημένη συστολή σε σύγκριση με τη 2<sup>η</sup> και 1<sup>η</sup> μέρα, σε αντιδιαστολή με τα PDFs που περιείχαν διττανθρακικά όπου η συστολή της 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> μέρας δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους αλλά μόνο με τη συστολή της 1<sup>ης</sup> μέρας. Παράλληλα οι ωσμωτικότητες των υγρών που περιέβαλλαν τη γέλη στα διαλύματα που περιείχαν διττανθρακικά ήταν σημαντικά χαμηλότερες από εκείνες των PDFs με γαλακτικά. Και στις 4 περιπτώσεις PDFs καθημερινά η ωσμωτικότητα των υγρών που περιέβαλλαν τις γέλες αυξανόταν σημαντικά έως και την 3<sup>η</sup> μέρα. Παρά το γεγονός ότι οι όγκοι των υγρών που είχαν παγιδευτεί στις γέλες την 3<sup>η</sup> μέρα δεν διέφεραν σημαντικά, οι ωσμωτικότητες τους παρουσίαζαν αντίστοιχες τιμές με τα υγρά που περιέβαλλαν τις γέλες. Αυτό σημαίνει πως υπήρχε ισορροπία στις ωσμωτικότητες των υγρών εντός και εκτός γέλης όπως θα ήταν αναμενόμενο. Ενδιαφέρον εύρημα είναι πως όσο η συστολή των γελών αυξανόταν κάθε ημέρα παράλληλα οι ωσμωτικότητες των υγρών αυξανόνταν κάθε μέρα. Κάτι τέτοιο ενδεχομένως να υποδηλώνει πως ωσμωτικά ενεργά

σωματίδια αποβάλλονται από τα κύτταρα κατά την αυξανόμενη συστολή των κυττάρων εντός της γέλης. Πειράματα που να κάνουν χρήση της δοκιμασίας συστολής γέλης κολλαγόνου με ενσωματωμένα μεσοθηλιακά κύτταρα στο πλαίσιο της διερεύνησης του μηχανισμού μεσοθηλιακής-προς-μεσεγγυματική μετάβαση στην ΠΚ δεν υπάρχουν. Υπάρχουν όμως δεδομένα με χρήση της δοκιμασίας σε πρωτογενή ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα υπεζωκότα από ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση που δείχνουν πως υπό το ερέθισμα του TGF-β τα κύτταρα οδηγούνται σε αυξημένη συστολή της γέλης κολλαγόνου (117). Στην πρώτη μελέτη που περιέγραψε τη διαδικασία του MMT στα μεσοθηλιακά κύτταρα υπό την επίδραση του TGF-β πριν από 15 χρόνια, ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων έδειξε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό, την κυτταρική προσκόλληση, τη σηματοδότηση μέσω κυτταροκινών, την απόκριση στο στρες και με μεταβολικές διαδικασίες (112). Είναι πιθανό στο σύστημα που δοκιμάστηκε πειραματικά στην παρούσα μελέτη η έκθεση στα PDFs να οδηγεί σε έκκριση TGF-β από τα μεσοθηλιακά κύτταρα και λόγω αυτού του σήματος οι γέλες λόγω συστολής να εμφανίζουν προοδευτικά μικρότερη επιφάνεια (114).

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιικής εργασίας δείχνουν πως οι επιδράσεις των εμπορικά διαθέσιμων υγρών ΠΚ σε ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα διαφέρουν αναφορικά με την αλλαγή που επιφέρουν στη διαμεσοθηλιακή παρακυτταρική διαπερατότητα αλλά και στην επαγωγή μεσοθηλιακής-προς-μεσεγγυματική μετάβαση και στην ανάδειξη ενός συσταλτού φαινοτύπου. Φαίνεται πως τα βιοσυμβατά υγρά ΠΚ μεσολαβούν σε μεγαλύτερο βαθμό τη διέλευση μορίων μεσαίου μοριακού βάρους και επιφέρουν μεταβολές στη μεσοθηλιακή μονοστιβάδα που είναι παροδικές σε αντίθεση με το συμβατικό υγρό ΠΚ που δοκιμάστηκε. Επιπλέον το υγρό ΠΚ που έχει μόνο διττανθρακικά σαν ρυθμιστικό παράγοντα δείχνει να επάγει σημαντικά ηπιότερο συσταλτό φαινότυπο στα μεσοθηλιακά κύτταρα σε σχέση με τα άλλα υγρά ΠΚ που δεν διέφεραν στο τελικό αποτέλεσμα.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ansari N. Peritoneal Dialysis in Renal Replacement Therapy for Patients with Acute Kidney Injury. *Int J Nephrol* [Internet]. 2011;2011(Table 1):1–10. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ijn/2011/739794/>
2. Nolph K.D. Peritoneal anatomy and transport physiology. *Replace Ren Funct by Dial.* 1983;Nolph K.D.:516–36.
3. Cho Y, Badve S V., Hawley CM, Wiggins K, Johnson DW. Biocompatible peritoneal dialysis fluids: Clinical outcomes. *Int J Nephrol.* 2012;2012(Table 1).
4. Davies SJ. Longitudinal relationship between solute transport and ultrafiltration capacity in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int.* 2004;66(6):2437–45.
5. Gokal R. Peritoneal Dialysis in the 21st Century: An Analysis of Current Problems and Future Developments. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2002;13(suppl 1):S104–15. Available from: [http://jasn.asnjournals.org/content/13/suppl\\_1/S104%5Cnhttp://jasn.asnjournals.org/content/13/suppl\\_1/S104.full.pdf%5Cnhttp://jasn.asnjournals.org/content/13/suppl\\_1/S104.short](http://jasn.asnjournals.org/content/13/suppl_1/S104%5Cnhttp://jasn.asnjournals.org/content/13/suppl_1/S104.full.pdf%5Cnhttp://jasn.asnjournals.org/content/13/suppl_1/S104.short)
6. Holmes CJ, Faict D. Peritoneal dialysis solution biocompatibility: definitions and evaluation strategies. *Kidney Int Suppl.* 2003;64(88):S50–6.
7. Isaza-Restrepo A, Martin-Saavedra JS, Velez-Leal JL, Vargas-Barato F, Riveros-Dueñas R. The peritoneum: Beyond the tissue - A review. *Front Physiol.* 2018;9(JUN):1–12.
8. Blackburn SC, Stanton MP. Anatomy and physiology of the peritoneum. *Semin Pediatr Surg* [Internet]. 2014;23(6):326–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2014.06.002>
9. Aguirre AR, Abensur H. Physiology of fluid and solute transport across the peritoneal membrane. *J Bras Nefrol* [Internet]. 2014;36(1):74–9. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0101-2800.20140013>
10. Williams JD, Craig KJ, Ruhland C Von, Topley N, Williams GT. The natural course of peritoneal membrane biology during peritoneal dialysis. *Kidney Int* [Internet]. 2003;64:S43–9. Available from: <http://www.nature.com.janus.lib.rue.nl/ki/journal/v64/n88s/full/4494220a.html%5Cnhttp://www.nature.com.janus.lib.rue.nl/ki/journal/v64/n88s/pdf/4494220a.pdf>
11. Zocchi L. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J.* 2002;20(6):1545–58.

12. Avni FE, Humphries P. Diseases of the peritoneum, mesentery, and omentum. *Imaging Acute Abdomen Child*. 2017;179–96.
13. Rippe B, Stelin G, Haraldsson B. Computer simulations of peritoneal fluid transport in CAPD. *Kidney Int*. 1991;40(2):315–25.
14. Simmen H. Analysis of pH and pO<sub>2</sub> in Abscesses , Peritoneal Fluid , and Drainage Fluid in the Presence or Absence of Bacterial Infection During and Mter. Surgery. 1993;165(July):0–3.
15. DiZegera GS. Peritoneal Fluid. *The Peritoneum*. 1992;c:26–7.
16. Winters N, Bader D. Development of the Serosal Mesothelium. *J Dev Biol* [Internet]. 2013;1(2):64–81. Available from: <http://www.mdpi.com/2221-3759/1/2/64>
17. Kawanishi K. Diverse properties of the mesothelial cells in health and disease. 2016;1(2):79–89.
18. Flessner MF. Peritoneal transport physiology: insights from basic research. *J Am Soc Nephrol*. 1991;2(2):122–35.
19. Curry FE, Michel CC. A fiber matrix model of capillary permeability. *Microvasc Res*. 1980;20(1):96–9.
20. Baradi AF, Rao SN. A Scanning Electron Microscope Study of Mouse Peritoneal Mesothelium. 1976;8(1):159–62.
21. Mutsaers SE. Mesothelial cells : Their structure , function and role in serosal repair. 2002;171–91.
22. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(1):9–16.
23. Mutsaers SE, Birnie K, Lansley S, Herrick SE, Lim CB, Prêle CM. Mesothelial cells in tissue repair and fibrosis. *Front Pharmacol*. 2015;6(MAY):1–12.
24. Zarogiannis S, Kourti P, Hatzoglou C, Liakopoulos V, Poultzidi A, Gourgoulis K, et al. Influence of the sodium transport inhibition by amiloride on the transmesothelial resistance of isolated visceral sheep peritoneum. *Adv Perit Dial*. 2005;21:5–8.
25. Liakopoulos V, Zarogiannis S, Hatzoglou C, Kourti P, Poultzidi A, Eleftheriadis T, et al. Inhibition by mercuric chloride of aquaporin-1 in the parietal sheep peritoneum: an electrophysiologic study. *Adv Perit Dial*. 2006;22:7–10.
26. Stefanidis I, Zarogiannis S, Hatzoglou C, Liakopoulos V, Kourti P, Poultzidi A, et al. Enhancement of the Transmesothelial Resistance of the Parietal Sheep Peritoneum by Epinephrine In Vitro: Ussing-type Chamber Experiments. *Artif Organs* [Internet]. 2005 Nov 1 [cited 2018 Sep 28];29(11):919–22. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1525-1594.2005.00157.x>



27. Stefanidis I, Liakopoulos V, Kourti P, Zarogiannis S, Poultzidi A, Mertems PR, et al. Amiloride-sensitive sodium channels on the parietal human peritoneum: Evidence by ussing-type chamber experiments. *ASAIO J.* 2007;53(3):335–8.
28. Zarogiannis S, Liakopoulos V, Hatzoglou C, Kourti P, Vogiatzidis K, Potamianos S, et al. Effect of sodium-potassium pump inhibition by ouabain on the permeability of isolated visceral sheep peritoneum. *Adv Perit Dial.* 2007;23:43–7.
29. DiZerega GS, Campeau JD. Peritoneal repair and post-surgical adhesion formation. *Hum Reprod Update.* 2001;7(6):547–55.
30. Mutsaers SE, Wilkosz S. Structure and function of mesothelial cells. *Cancer Treat Res.* 2007;134:1–19.
31. Li FK, Davenport A, Robson RL, Loetscher P, Rothlein R, Williams JD, et al. Leukocyte migration across human peritoneal mesothelial cells is dependent on directed chemokine secretion and ICAM-1 expression. *Kidney Int.* 1998;54(6):2170–83.
32. Herrick SE, Mutsaers SE. Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):621–42.
33. Witowski J, Książek K, Jörres A. New insights into the biology of peritoneal mesothelial cells: The roles of epithelial-to-mesenchymal transition and cellular senescence. *Nephron - Exp Nephrol.* 2008;108(4).
34. Liu Y, Dong Z, Liu H, Zhu J, Liu F, Chen G. Transition of mesothelial cell to fibroblast in peritoneal dialysis: EMT, stem cell or bystander? *Perit Dial Int.* 2015;35(1):14–25.
35. Leyboldt JK. Solute transport across the peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13 Suppl 1:S84–91.
36. Waniewski J. Peritoneal fluid transport: Mechanisms, pathways, methods of assessment. *Arch Med Res [Internet].* 2013;44(8):576–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.10.010>
37. Devuyst O, Goffin E. Water and solute transport in peritoneal dialysis: models and clinical applications. *Nephrol Dial Transplant [Internet].* 2008;23(7):2120–3. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfn298>
38. Rippe B. Free water transport, small pore transport and the osmotic pressure gradient three-pore model of peritoneal transport. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(7):2147–53.
39. Aanen MC, Venturoli D, Davies SJ. A detailed analysis of sodium removal by peritoneal dialysis: Comparison with predictions from the three-pore model of membrane function. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(April 2005):1192–200.
40. Devuyst O, Ni J. Aquaporin-1 in the peritoneal membrane: Implications for water

- transport across capillaries and peritoneal dialysis. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2006;1758(8):1078–84.
41. Yang B, Folkesson HG, Yang J, Matthay MA, Ma T, Verkman AS. Reduced osmotic water permeability of the peritoneal barrier in aquaporin-1 knockout mice. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 1999;276(1):C76-81. Available from: <http://ajpcell.physiology.org/content/276/1/C76>
  42. Waniewski J, Poleszczuk J, Antosiewicz S, Baczynński D, Gałach M, Pietribiasi M, et al. Can the three pore model correctly describe peritoneal transport of protein? *ASAIO J.* 2014;60(5):576–81.
  43. Kaissling B, Le Hir M. The renal cortical interstitium: Morphological and functional aspects. *Histochem Cell Biol.* 2008;130(2):247–62.
  44. Stachowska-Pietka J, Waniewski J, Flessner MF, Lindholm B. Concomitant bidirectional transport during peritoneal dialysis can be explained by a structured interstitium. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* [Internet]. 2016;310(11):H1501–11. Available from: <http://ajpheart.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpheart.00925.2014>
  45. Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS. Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(9):564–80.
  46. O'Donnell MJ, Maddrell SH. Paracellular and transcellular routes for water and solute movements across insect epithelia. *J Exp Biol.* 1983;106(1983):231–53.
  47. Fischbarg J. Fluid Transport Across Leaky Epithelia: Central Role of the Tight Junction and Supporting Role of Aquaporins. *Physiol Rev* [Internet]. 2010;90(4):1271–90. Available from: <http://physrev.physiology.org/content/90/4/1271.abstract%5Cnhttp://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00025.2009>
  48. Zhang GH, Wu LL, Yu GY. Tight junctions and paracellular fluid and ion transport in salivary glands. *Chin J Dent Res.* 2013;16(October):13–46.
  49. Constanze Will, Michael Fromm DM. Claudin Tight Junction Proteins : Novel Aspects in Paracellular Transport. 2008;28(1):577–84.
  50. FARQUHAR MG, PALADE GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 1963;17:375–412.
  51. Liang GH, Weber CR. Molecular aspects of tight junction barrier function. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2014;19:84–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2014.07.017>
  52. Tang VW, Goodenough DA. Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys J.*

- 2003;84(3):1660–73.
53. Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: Basic structure and function. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2007;127(11):2525–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700865>
  54. Gonzalezmariscal L. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*. 2003;81(1):1–44.
  55. Claude P. Morphological factors influencing transepithelial permeability: A model for the resistance of the Zonula Occludens. *J Membr Biol*. 1978;39(2–3):219–32.
  56. Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2002;283(1):C142–7. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00038.2002>
  57. Colegio OR, Itallie C V., Rahner C, Anderson JM. Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *AJP Cell Physiol* [Internet]. 2003;284(6):C1346–54. Available from: <http://ajpcell.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpcell.00547.2002>
  58. Koval M. Claudins - Key pieces in the tight junction puzzle. *Cell Commun Adhes*. 2006;13(3):127–38.
  59. Günzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol*. 2012;2(3):1819–52.
  60. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2008;1778(3):631–45.
  61. Günzel D, Zakrzewski SS, Schmid T, Pangalos M, Wiedenhoeft J, Blasse C, et al. From TER to trans- and paracellular resistance: lessons from impedance spectroscopy. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2012 Jun 1 [cited 2018 Sep 11];1257(1):142–51. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2012.06540.x>
  62. Barone RJ, Cámpora MI, Gimenez NS, Ramirez L, Panese SA, Santopietro M. Peritoneal dialysis as a first versus second option after previous haemodialysis: A very long-term assessment. *Int J Nephrol*. 2014;2014.
  63. Guest S, Akonur A, Ghaffari A, Sloand J, Leyboldt JK. Intermittent peritoneal dialysis: Urea kinetic modeling and implications of residual kidney function. *Perit Dial Int*. 2012;32(2):142–8.
  64. Ellam T, Wilkie M. Peritoneal dialysis. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2015;43(8):484–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357303915001139>
  65. Heimbürger O, Waniewski J, Werynski A, Lindholm B. A quantitative description of

- solute and fluid transport during peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 1992;41(5):1320–32.
66. Kiil F. Mechanism of osmosis. *Kidney Int.* 1982;21(2):303–8.
  67. Park MS, Lee EY, Suh G Il, Waniewski J, Werynski A, Lee HB. Peritoneal transport of glucose in rat. *Perit Dial Int.* 1999;19(5):442–50.
  68. Chen TW, Khanna R, Moore H, Twardowski ZJ, Nolph KD. Sieving and reflection coefficients for sodium salts and glucose during peritoneal dialysis in rats. *J Am Soc Nephrol [Internet]*. 1991;2(6):1092–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1777590>
  69. Zhang W, Freichel M, Van Der Hoeven F, Nawroth PP, Katus H, Kälble F, et al. Novel endothelial cell-specific AQP1 knockout mice confirm the crucial role of endothelial AQP1 in ultrafiltration during peritoneal dialysis. *PLoS One.* 2016;11(1):1–15.
  70. Akonur A, Guest S, Sloand JA, Leyboldt JK. Automated peritoneal dialysis prescriptions for enhancing sodium and fluid removal: A predictive analysis of optimized, patient-specific dwell times for the day period. *Perit Dial Int.* 2013;33(6):646–54.
  71. Bieber SD, Burkart J, Golper TA, Teitelbaum I, Mehrotra R. Comparative outcomes between continuous ambulatory and automated peritoneal dialysis: A narrative review. *Am J Kidney Dis [Internet]*. 2014;63(6):1027–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2013.11.025>
  72. Λιακόπουλος Β, Λειβαδίτης Κ, Ντόμπρος ΝΒ, Νικολαΐδης Π, Ωραιόπουλος ΔΓ. Συνεχής Φορητή ή Αυτοματοποιημένη Περιτοναϊκή Κάθαρση ; 2013;25:54–62.
  73. Gotloib L. The mesothelium under the siege of dialysis solutions: old glucose, new glucose, and glucose-free osmotic agents. *Adv Perit Dial [Internet]*. 2009;25:6–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19886309>
  74. He Q, Zhang W, Chen J. A meta-analysis of icodextrin versus glucose containing peritoneal dialysis in metabolic management of peritoneal dialysis patients. *Ren Fail.* 2011;33(10):943–8.
  75. Miyata T, Horie K, Ueda Y, Fujita Y, Izuhara Y, Hirano H, et al. Advanced glycation and lipidoxidation of the peritoneal membrane: Respective roles of serum and peritoneal fluid reactive carbonyl compounds. *Kidney Int.* 2000;58(1):425–35.
  76. Boulanger E, Wautier MP, Gane P, Mariette C, Devuyst O, Wautier JL. The triggering of human peritoneal mesothelial cell apoptosis and oncosis by glucose and glycoxydation products. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(9):2208–16.
  77. Witowski J, Korybalska K, Wisniewska J, Breborowicz A, Gahl GM, Frei U, et al. Effect of glucose degradation products on human peritoneal mesothelial cell function. *J Am Soc*

- Nephrol. 2000;11(4):729–39.
78. Rodríguez-Esparragón F, Marrero-Robayna S, González-Cabrera F, Hernández-Trujillo Y, Buset-Ríos N, Carlos Rodríguez-Pérez J, et al. Peritoneal dialysis fluid biocompatibility impact on human peritoneal membrane permeability. *Clin Kidney J* [Internet]. 2018;(August):1–8. Available from: <https://academic.oup.com/ckj/advance-article/doi/10.1093/ckj/sfy043/5045230>
  79. Breborowicz A, Oreopoulos DG. Biocompatibility of peritoneal dialysis solutions. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 1996;27(5):738–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8629638>
  80. Kopple JD, Bernard D, Messana J, Swartz R, Bergström J, Lindholm B, et al. Treatment of malnourished CAPD patients with an amino acid based dialysate. *Kidney Int*. 1995;47(4):1148–57.
  81. Wang T, Heimbürger O, Bergström J, Lindholm B. Nutritional problems in peritoneal dialysis: An overview. *Perit Dial Int*. 1999;19(SUPPL. 2).
  82. Sezer MT, Demir M, Ertürk J, Yildiz M. Effects of amino acid peritoneal dialysate in malnourished peritoneal dialysis patients. *Eur J Gen Med*. 2006;3(2):58–63.
  83. Ho-Dac-Pannekeet MM, Schouten N, Langendijk MJ, Hiralall JK, De Waart DR, Struijk DG, et al. Peritoneal transport characteristics with glucose polymer based dialysate. *Kidney Int*. 1996;50(3):979–86.
  84. Moberly JB, Mujais S, Gehr T, Hamburger R, Sprague S, Kucharski A, et al. Pharmacokinetics of icodextrin in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int Suppl*. 2002;62(81):S23–33.
  85. Khalifeh N, Vychytil A, Hörl WH. The role of peritoneal dialysis in the management of treatment-resistant congestive heart failure: A European perspective. *Kidney Int*. 2006;70(SUPPL. 103):72–5.
  86. Ahmad M, Shah H, Pliakogiannis T, Oreopoulos DG. Prevention of membrane damage in patient on peritoneal dialysis with new peritoneal dialysis solutions. *Int Urol Nephrol*. 2007;39(1):299–312.
  87. Schmitt CP, Aufricht C. Is there such a thing as biocompatible peritoneal dialysis fluid? *Pediatr Nephrol*. 2017;32(10):1835–43.
  88. Krediet RT, Lindholm B, Rippe B. Pathophysiology of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int*. 2000;20(SUPPL. 4).
  89. Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* [Internet]. 1999;55(1):341–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00264.x>

90. Davies SJ, Phillips L, Griffiths AM, Russell LH, Naish PF, Russell GI. What really happens to people on long-term peritoneal dialysis? *Kidney Int.* 1998;54(6):2207–17.
91. Fusshoeller A. Histomorphological and functional changes of the peritoneal membrane during long-term peritoneal dialysis. *Pediatr Nephrol.* 2008;23(1):19–25.
92. Mazzon E, Cuzzocrea S. Role of TNF- $\alpha$  in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. *Respir Res.* 2007;8:1–19.
93. Peppas VI, Arsenopoulou Z V., Zarogiannis SG, Deligiorgi T, Jagirdar R, Makantasis I, et al. VEGF increases the permeability of sheep pleura ex vivo through VEGFR2 stimulation. *Cytokine* [Internet]. 2014 Oct [cited 2018 Sep 28];69(2):284–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466614001744>
94. Offner FA, Feichtinger H, Stadlmann S, Obrist P, Marth C, Klingler P, et al. Transforming growth factor-beta synthesis by human peritoneal mesothelial cells. Induction by interleukin-1. *Am J Pathol* [Internet]. 1996;148(5):1679–88. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1861567&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
95. Hills CE, Siamantouras E, Smith SW, Cockwell P, Liu KK, Squires PE. TGF $\beta$  modulates cell-to-cell communication in early epithelial-to-mesenchymal transition. *Diabetologia.* 2012;55(3):812–24.
96. López-Cabrera M. Mesenchymal Conversion of Mesothelial Cells Is a Key Event in the Pathophysiology of the Peritoneum during Peritoneal Dialysis. *Adv Med* [Internet]. 2014;2014:1–17. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/amed/2014/473134/>
97. De Vriese AS, Flyvbjerg A, Mortier S, Tilton RG, Lameire NH. Inhibition of the interaction of AGE-RAGE prevents hyperglycemia-induced fibrosis of the peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2003;14(8):2109–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874465>
98. Aroeira LS, Aguilera A, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Pérez-Lozano ML, Cirugeda A, et al. Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis: Role of vascular endothelial growth factor. *Am J Kidney Dis.* 2005;46(5):938–48.
99. Zareie M, De Vriese AS, Hekking LHP, ter Wee PM, Schalkwijk CG, Driesprong BAJ, et al. Immunopathological changes in a uraemic rat model for peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(7):1350–61.
100. Flessner MF, Choi J, Vanpelt H, He Z, Credit K, Henegar J, et al. Correlating structure with solute and water transport in a chronic model of peritoneal inflammation. *Am J*

- Physiol Renal Physiol. 2006;290(1):F232–40.
101. Termorshuizen F, Korevaar JC, Dekker FW, Van Manen JG, Boeschoten EW, Krediet RT. Hemodialysis and Peritoneal Dialysis: Comparison of Adjusted Mortality Rates According to the Duration of Dialysis: Analysis of the Netherlands Cooperative Study on the Adequacy of Dialysis 2. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(11):2851–60.
  102. Ayuzawa N, Ishibashi Y, Takazawa Y, Kume H, Fujita T. Peritoneal morphology after long-term peritoneal dialysis with biocompatible fluid: Recent clinical practice in Japan. *Perit Dial Int*. 2012;32(2):159–67.
  103. Teitelbaum I. Ultrafiltration failure in peritoneal dialysis: A pathophysiologic approach. *Blood Purif*. 2015;39(1–3):70–3.
  104. Rippe B, Simonsen O, Heimbürger O, Christensson A, Haraldsson B, Stelin G, et al. Long-term clinical effects of a peritoneal dialysis fluid with less glucose degradation products. *Kidney Int*. 2001;59(1):348–57.
  105. Leung JCK, Chan LYY, Li FFK, Tang SCW, Chan KW, Chan TM, et al. Glucose degradation products downregulate ZO-1 expression in human peritoneal mesothelial cells: the role of VEGF. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2018 Sep 7];20(7):1336–49. Available from: <http://academic.oup.com/ndt/article/20/7/1336/1912055/Glucose-degradation-products-downregulate-ZO1>
  106. Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, et al. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2002;13(2):470–9. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11805177&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/365CCF4B-193B-42BB-9313-D6DC41BE21A4>
  107. Brimble KS. Meta-Analysis: Peritoneal Membrane Transport, Mortality, and Technique Failure in Peritoneal Dialysis. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2006;17(9):2591–8. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2006030194>
  108. Fusshöller A, zur Nieden S, Grabensee B, Plum J. Peritoneal fluid and solute transport: influence of treatment time, peritoneal dialysis modality, and peritonitis incidence. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2002;13(4):1055–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11912266>
  109. Ito T, Yorioka N, Kyuden Y, Asakimori Y, Kiribayashi K, Ogawa T, et al. Effect of glucose polymer on the intercellular junctions of cultured human peritoneal mesothelial

- cells. *Nephron Clin Pract*. 2003;93(23):c97–105.
110. Horiuchi T, Matsunaga K, Banno M, Nakano Y, Nishimura K, Hanzawa C, et al. Tight Junction-Associated Proteins Due To a Higher. 2009;29(2):217–26.
  111. Saker S, Stewart EA, Browning AC, Allen CL, Amoaku WM. The effect of hyperglycaemia on permeability and the expression of junctional complex molecules in human retinal and choroidal endothelial cells. *Exp Eye Res* [Internet]. 2014;121:161–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2014.02.016>
  112. Debray-García Y, Sánchez EI, Rodríguez-Muñoz R, Venegas MA, Velazquez J, Reyes JL. Diabetes and exposure to peritoneal dialysis solutions alter tight junction proteins and glucose transporters of rat peritoneal mesothelial cells. *Life Sci* [Internet]. 2016;161:78–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.07.018>
  113. Tien T, Barrette KF, Chronopoulos A, Roy S. Effects of high glucose-induced Cx43 downregulation on occludin and ZO-1 expression and tight junction barrier function in retinal endothelial cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(10):6518–25.
  114. Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, Jiménez-Heffernan JA, et al. Peritoneal Dialysis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Mesothelial Cells. *N Engl J Med* [Internet]. 2003;348(5):403–13. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa020809>
  115. Yang AH, Chen JY, Lin JK. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int*. 2003;63(4):1530–9.
  116. Ngo P, Ramalingam P, Phillips JA, Furuta GT. Collagen Gel Contraction Assay. *Cell-Cell Interact Heal Dis* [Internet]. 341:103–10. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/1-59745-113-4:103>
  117. Zolak JS, Jagirdar R, Surolia R, Karki S, Oliva O, Hock T, et al. Pleural mesothelial cell differentiation and invasion in fibrogenic lung injury. *Am J Pathol* [Internet]. 2013;182(4):1239–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.12.030>